

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : 05-180773
 (43) Date of publication / application : 23.07.1993

(51) Int.Cl.

GO1N 21/76
 GO1N 33/543
 // C12Q 1/68

(21) Application number : 04-131039
 (22) Date of filing : 22.05.1992

(71) Applicant : SYNTEX USA INC
 (72) Inventor : ULLMAN EDWIN F
 KIRAKOSSIAN HRAIR
 JOHN S PEASE
 YURI DANILOFF
 DANIEL B WAGNER

(30) Priority

Priority number : 91 704569 Priority date : 22.05.1991 Priority country : US
 91 718490 20.06.1991 US

(54) ANALYZING METHOD UTILIZING LUMINESCENCE

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a method for measuring a substance to be inspected in a medium suspected of containing the substance to be inspected.

CONSTITUTION: A medium suspected of containing a substance to be inspected is treated under a condition generating the movement to the near contact position of a photosensitizer and a chemoluminescent compd. if the substance to be inspected is present. The photosensitizer generates singlet oxygen to activate the chemoluminescent compd. present at the contact near position. Subsequently, the activated chemoluminescent compd. emits light. The quantity of the emitted light is correlated with the amt. of the substance to be inspected contained in the medium. At least one of the photosensitizer and the chemoluminescent compd. pref. associates with usually suspensible particles on the surfaces of the particles and the member of a specific coupling pair (sbp) is coupled with the particles.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 04.03.1999
 [Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C): 1998,2000 Japanese Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-180773

(43)公開日 平成5年(1993)7月23日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
G 01 N 21/76		7906-2J		
33/543		D 7906-2J		
// C 12 Q 1/68		A 8114-4B		

審査請求 未請求 請求項の数27(全 65 頁)

(21)出願番号 特願平4-131039

(22)出願日 平成4年(1992)5月22日

(31)優先権主張番号 704569

(32)優先日 1991年5月22日

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 718490

(32)優先日 1991年6月20日

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 391039243

シンテックス(ユー・エス・エイ)インコ
ーポレイテッド
SYNTEX (U. S. A.) INCOR
PORATEDアメリカ合衆国94304カリフォルニア州
パロ・アルト、ヒルビュー・アベニュー
3401番

(72)発明者 エド温イン エフ. ウルマン

アメリカ合衆国カリフォルニア州アサート
ン、セルビィ レーン 135

(74)代理人 弁理士 浅村皓(外3名)

最終頁に続く

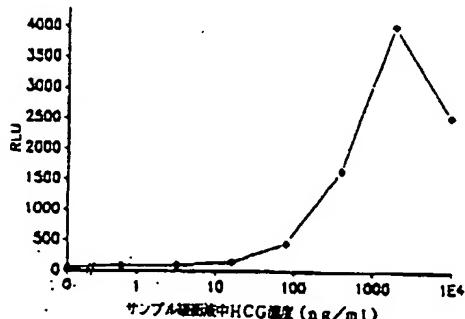
(54)【発明の名称】ルミネセンスを利用する分析方法

(57)【要約】(修正有)

【目的】被検物質の含有が疑われるメジウム中の被検物質の測定方法を提供する。

【構成】被検物質の含有が疑われるメジウムを、被検物質が存在すれば、フォトセンシタイザーと化学ルミネッセンス化合物の接する近位への移動が起こる条件下に処理することからなる。フォトセンシタイザーは一重項酸素を発生し、接する近位に存在する化学ルミネッセンス化合物を活性化する。ついで、活性化された化学ルミネッセンス化合物が光を生成する。生成した光の量はメジウム中の被検物質の量に相関する。フォトセンシタイザーおよび化学ルミネッセンス化合物の少なくとも一方は、好ましくは、通常懸濁可能な粒子とその表面で会合し、それには特異的結合対(s b p)のメンバーが結合している。

HCGアッセイ検査曲線



【特許請求の範囲】

【請求項1】 被検物質の含有が疑われるメジウムを処理して本質的に準安定な種を形成させ、この種はメジウム中に拡散可能で上記被検物質の存在によってその種に接する近位に移動するメジウム中の物質と優先的に反応することが可能であり、この種がメジウム中の被検物質の量を指示する上記物質との反応を生じたかどうかを測定することからなる被検物質の分析方法

【請求項2】 被検物質の含有が疑われるメジウムを被検物質が存在すれば特異的結合対(s bp)複合体を形成するように処理し、この複合体が形成されたかどうかを測定する工程からなる液体メジウム中の被検物質のアッセイにおいて、フォトセンシタイザーの活性化に応じて化学ルミネッセンス化合物から放射される光量がメジウム中の被検物質量に相関する(1)特異的結合対(s bp)のメンバーに会合したフォトセンシタイザーと(2)s bpメンバーに会合した化学ルミネッセンス化合物とを上記メジウムに混合することからなる改良方法

【請求項3】 被検物質の含有が疑われるメジウムを、被検物質が存在すればフォトセンシタイザーと化学ルミネッセンス化合物が接する近位に移動してそのフォトセンシタイザーによって生成される一重項酸素がその化学ルミネッセンス化合物を活性化しついで光を発生するような条件下に処理し、上記メジウム中の被検物質量に相関するその光量を測定することからなる被検物質の定量方法

【請求項4】 化学ルミネッセンス化合物はオレフィン基およびそのオレフィン基と共に共役する1個または2個以上の電子供与置換基を含有する「請求項3」記載の方法

【請求項5】 化学ルミネッセンス化合物は9-アルキリデン-*N*-メチルアクリダン類、エノールエーテル類、およびエナミン類から選択される「請求項3」記載の方法

【請求項6】 フォトセンシタイザーまたは上記化学ルミネッセンス化合物の少なくとも一方は、懸濁可能な粒子とその表面で会合している「請求項3」記載の方法

【請求項7】 表面も接する近位に同様に移動し、表面は懸濁可能な粒子上に存在し、この粒子はラテックス粒子、脂質二重層、油滴、シリカ粒子、金属ゾル、および染料微結晶からなる群より選ばれる「請求項3」記載の方法

【請求項8】 フォトセンシタイザーはメチレンブルー、ローズベンガル、ポルフィリン類およびフタロシアニン類からなる群より選ばれる染料である「請求項3」記載の方法

【請求項9】 上記フォトセンシタイザーおよび上記化学ルミネッセンス化合物はそれぞれ、それが会合する特異的結合対(s bp)を有し、このs bpメンバーは独立に、リガンド、受容体、ポリスクレオチド、およびポリスクレオチド結合物質からなる群より選ばれる「請求

【項3】記載の方法

【請求項10】 (a) (1) 被検物質の含有が疑われるメジウム、(2)励起状態において酸素を一重項酸素に活性化できるフォトセンシタイザーであって、特異的結合対(s bp)のメンバーに会合したフォトセンシタイザー、および(3)化学ルミネッセンス化合物からなる特定の懸濁可能な粒子であって、それに予めs bpメンバーが結合されている粒子、の混合物を準備し、(b) この混合物を光で処理してフォトセンシタイザーを励起させ、(c) その混合物から放射される、上記メジウム中の被検物質量に相関するルミネッセンス量について上記混合物を調べることからなる被検物質の定量方法

【請求項11】 (a) (1) 被検物質の含有が疑われるメジウム、(2)第一のs bpメンバーに会合したフォトセンシタイザー、および第二のs bpメンバーに会合した化学ルミネッセンス化合物からなる混合物を準備し、(b) この混合物を光で処理してフォトセンシタイザーを励起させ、(c) 上記メジウムから放射され、上記メジウム中の被検物質量に相関するルミネッセンス量について上記混合物を調べることからなる被検物質の定量方法

【請求項12】 (a) (1) 被検物質の含有が疑われるサンプル、(2)化学ルミネッセンス化合物が導入された第一の懸濁可能な粒子であって、予めs bpメンバーが結合されている粒子、(3)励起状態において酸素を一重項酸素に活性化できるフォトセンシタイザーが導入された第二の懸濁可能な粒子であって、予め特異的結合対(s bp)のメンバーが結合されている粒子、をメジウム中に混合し、(b) 上記メジウムを照射して一重項酸素を生成させ、(c) 上記メジウムから放射され、上記メジウム中の被検物質量に相関するルミネッセンスの量を測定することからなる被検物質の定量方法

【請求項13】 第一のs bpメンバーに会合した化学ルミネッセンス化合物、および第二のs bpメンバーに会合し励起状態において酸素を一重項酸素に活性化できるフォトセンシタイザーのパッケージされた組み合わせであるキット

【請求項14】 (1) 化学ルミネッセンス化合物を包含する懸濁可能な粒子であって、予めs bpメンバーが結合されている粒子からなる組成物、および(2)上記組成物には含まれない、励起状態において酸素を一重項酸素に活性化できるフォトセンシタイザーのパッケージされた組み合わせである「請求項13」記載のキット

【請求項15】 フォトセンシタイザーを包含する第二の懸濁可能な粒子であって、予めs bpメンバーが結合されている粒子からなる組成物を含む「請求項14」記載のキット

【請求項16】 (1) 被検物質の含有が疑われるメジウム、(2)光化学的に活性化可能な化学ルミネッセン

3

ス化合物 (PACC) と会合し、上記被検物質の存在に相関して上記被検物質または第二の s b p メンバーと複合体を形成できる第一の特異的結合対 (s b p) メンバーからなる標識試薬の混合物を準備し、上記 PACC を光化学的に活性化し、上記 PACC によって生成され、上記メジウム中の被検物質量に相関するルミネッセンス量を検出することからなる被検物質の分析方法

【請求項 17】 光化学的活性化は上記 PACC と一重項酸素の反応による「請求項 16」記載の方法

【請求項 18】 一重項酸素はフォトセンシタイザーの活性化によって生成される「請求項 17」記載の方法

【請求項 19】 被検物質と第一の s b p メンバーは、リガンド、受容体、およびポリヌクレオチドからなる群よりそれぞれ独立に選択される「請求項 16」記載の方法

【請求項 20】 PACC はオレフィン基およびそのオレフィン基と共に共役する 1 個または 2 個以上の電子供与置換基を含有する「請求項 16」記載の方法

【請求項 21】 PACC は 9-アルキリデンアクリダン類、エノールエーテル類、9-アルキリデンキサンタン類およびエナミン類から選択される「請求項 16」記載の方法

【請求項 22】 (1) 被検物質の含有が疑われるメジウム、(2) 光化学的に活性化が可能な化学ルミネッセンス化合物 (PACC) に結合した特異的結合対 (s b p) メンバーからなる標識試薬を、上記メジウム中の被検物質量に相関して上記標識を包含する s b p メンバー複合体が形成される条件下にアッセイメジウム中に混合し、上記アッセイメジウムに光を照射して PACC を活性化し、上記メジウム中の被検物質量に相関するシグナルの存在または強度についてアッセイメジウムを調べることからなる被検物質の分析方法

【請求項 23】 PACC からのエネルギーによって活性化されるエネルギーアクセプターを包含させる「請求項 22」記載の方法

【請求項 24】 (1) 被検物質の含有が疑われるメジウム、(2) 一重項酸素との反応で化学ルミネッセンスを発生することができる化合物（「上記化合物」）に結合した特異的結合対 (s b p) メンバーからなる標識試薬、ならびに (3) 第二の s b p メンバーからなる不溶化試薬を、上記標識試薬と上記不溶化試薬を包含する s b p メンバー複合体が上記メジウム中の被検物質の存在に相関して形成される条件下、同時にまたは全部もしくは一部を順次、アッセイメジウム中に混合し、上記アッセイメジウムおよび上記不溶化試薬を分離し、上記アッセイメジウムまたは上記不溶化試薬上の上記化合物を光で活性化し、上記メジウムまたは上記試薬を上記メジウム中の被検物質量に相関するシグナルの存在または強度について調べることからなる被検物質の分析方法

【請求項 25】 (1) 被検物質の含有が疑われるメジ

4

ウム、(2) 一重項酸素との反応で化学ルミネッセンスを発生することができる化合物（「上記化合物」）に結合した第一の特異的結合対 (s b p) メンバーからなる標識試薬、(3) 一重項酸素発生物質、および (4) 第二の s b p メンバーに結合したまたは結合できる疎光エネルギーアクセプターからなる試薬を、上記標識試薬と上記エネルギーアクセプターを包含する s b p メンバー複合体が上記メジウム中の被検物質の存在に相関して形成され、上記化合物からのエネルギーが上記エネルギーアクセプターを活性化できる条件下、同時にまたは全部もしくは一部を順次、アッセイメジウム中に混合し、上記一重項酸素発生物質を活性化し、上記メジウムを上記メジウム中の被検物質量に相関するシグナルの存在または強度について調べることからなる被検物質の分析方法

【請求項 26】 特異的結合対のメンバーと会合した光化学的に活性化が可能な化学ルミネッセンス化合物 (PACC) からなる組成物

【請求項 27】 (1) 特異的結合対 (s b p) メンバーが結合した光化学的に活性化できる化学ルミネッセンス化合物 (PACC) からなる組成物、および (2) 上記組成物には含まれないフォトセンシタイザーのパッケージされた組み合わせであるキット

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

1. 発明の技術分野

本発明は試料中の被検物質を定量する方法、組成物、およびキットに関する。とりわけ本発明は別個の段階を必要としない特異的結合に基づく検定法に関する。

【0002】

【従来の技術】 臨床診断分野は近年、容易にかつ正確に定量しうる物質（被検物質）の多様性ならびにその定量法の両方に關して幅広い徴張をみた。液体中の低濃度の物質の存在を検出する便利で信頼できる危険のない手段が望まれている。臨床化学においてこれらの物質は体液中に 10^{-11} モル以下の濃度で存在することがある。これら低濃度物質を検出することのむずかしさは利用できる試料の量が比較的小さいことによって一層増大する。

【0003】 一検定法を開発する際には多くのことを考慮しなければならない。一つの考慮すべきことは、被検物質の濃度変化に対する信号の応答である。第二の考慮すべきことは、検定に対する実験計画案を容易に実施しうることである。考慮すべきことの第三は、試料毎の妨害物質の変動である。試薬の調製および精製の容易なこと、装置の入手性、オートメ化の容易なことおよび対象物質との相互作用も、有用な検定法を開発する上で更に考慮すべき諸問題である。

【0004】 一つの幅広い技術のカテゴリーは、被検物質の存在の閾値として標識されたリガンドの特別な場所の極性組織へ特異的に結合しうる受容体を使用すること

5

である。受容体による観察された結合効果は左右される。ある場合には、受容体の結合は単に結合した標識リガンドと非結合標識リガンドとの間の分子量の差を与えるだけである。他の場合には、

【0005】受容体の結合は、結合した標識リガンドと遊離標識リガンドとの分離を促進するか、あるいは標識リガンドに結合した受容体の量によって信号が変化するよう標識から得られる信号の性質に影響するかもしれない。更に一つの変法は受容体を標識しリガンドを標識しないことである。他方、受容体およびリガンド両方を標識するか、または異なる受容体を二つの異なる標識で標識する。このようにすると、これら標識がごく接近しているときには相互作用が起こり、存在するリガンド

【0006】の量は受容体の標識が相互作用しうる度合に影響を及ぼす。広範囲の異なるリガンドに適合しうる正確な新規技術に対し、あるいは他の方法が容易に適合し得ない特別な場合に使用できる正確な新規技術に対し、絶えざる要望がある。

【0007】均一系免疫検定法が小さい分子を対象として以前から記述されて来た。これら検定法の例として、特にSYVA'S FRATTM検定、EMITTM検定、酵素チャンネリング免疫検定、および蛍光エネルギー移動免疫検定(FETTM)、酵素阻害物質免疫検定(Hoffmann LaRoche and Abbott Laboratories)：蛍光偏光免疫検定(Dantlicker)があげられる。これらの

【0008】方法はすべて感度が限られていて、FETTMおよび酵素チャンネリング法を含む少数だけが大きい多重重ビトープ性被検物質に対し適している。

【0009】発光性化合物、例えば蛍光性化合物および化学発光性化合物は、光を放出するその能力の故に検定分野で広い応用が見出されている。この理由のため、核酸検定および免疫検定のような検定における標識として発光物質が利用されて来た。例えば、幾つかの特異的結合対を発光物質と抱合させ、種々な実験計画が用いられている。この発光物質抱合体を、被検物質を含むことが予想される試料中の被検物質の量と関連させて固相と液相との間に分配できる。これら相のいずれかのルミネッセンスを測定することにより、観察されたルミネッセンスのレベルと試料中の被検物質の濃度とを関連づけることができる。

【0010】リボソームおよび赤血球ゴーストといった粒子がカプセル化した水溶性物質の担体として利用されて来た。例えば、生物活性物質を種々な用途に向けて、例えばある薬剤をリボソーム調製中にトラップし次に処置すべき患者へ投与する薬物投与方式に向けて、カプセル化するためにリボソームが使用された。

【0011】ラテックスビーズおよびリボソームといった粒子も検定に利用されて来た。例えば、均一系検定法において、抗体または抗原で標識したりボソームの水相

6

に酵素をトラップすることができる。リボソームは試料および補体の存在下で酵素を遊離させる。水相中にカプセル化された水溶性蛍光染料または非蛍光染料を有

【0012】する、あるいは脂質小胞の脂質二重層中に溶解した脂溶性染料を有する抗体-または抗原-標識リボソームも、この表面に結合した抗体または抗原と免疫化学反応に入りうる被検物質に対する検定に利用されて来た。リボソームの水相から染料を解放するために染浄剤が使われた。

【0013】化学発光標識は配位子結合検定法で顕著な感度を示すが、一つ以上の化学的活性化工程を必要とするのが普通である。蛍光性標識はこの欠点をもたないが感度が低い。

【0014】結合する相手と共有結合でつながる基が化学的活性化によって光を発する免疫検定および核酸検定に対し化学発光標識が記述された。アクリジニウムエヌテルを利用する核酸検定キットがGenprobe (Pace 2 System (登録商品名)、サン・ジェゴ、カリフォルニア州) により販売され、またこの型の標識を使用するMagic Lite (登録商品名) 免疫検定キットがCIBA-GEIGY (バーゼル、スイス) により発売されている。

【0015】標識された核酸プローブから第二のプローブに結合された蛍光性受容体へのエネルギー移動がサンドイッチ核酸検定に対してHeller等、IおよびII (以下に述べる) により記述された。Maggio I (以下に述べる) は免疫検定に対する同様な手順を述べている。ポリスクリオチドに共有結合した発光物質から、間に挿入された発光物質へのエネルギー移動がHeller等、IV (以下に述べる) により記述されている。

【0016】間に挿入された染料からポリスクリオチド上の蛍光物質への移動は最近Cardullo等 (後述) により記述された。更にMc Capra (後述) は、標識としての光増感剤 (フォトセンシタイザー) の使用を記載しており、この場合光増感剤は酸素をその一重項状態に活性化し、次にこの一重項状態の酸素が加熱により光を発する化合物と反応する。

【0017】2. 関連技術の簡単な説明

40 欧州特許第0,345,776号明細書 (Mc Capra) は、標識として増感剤を利用する特異的結合検定を示している。この増感剤は、一つ以上の波長の放射線で、または他の化学的あるいは物理的刺激 (例えば、電子移動、電気分解、エレクトロルミネッセンスまたはエネルギー移動) で励起することによって刺激されたとき励起状態に達し、そしてこの状態は(イ)分子状の酸素との相互作用により一重項分子酸素をつくり出す、あるいは(ロ)ロイコ染料との相互作用によって還元形 (これは分子状の酸素との相互作用によりもとの非励起状態に戻り、結果として過酸化水素を生ずる) をと

(5)

特開平5-180773

7

るというどの部分も包含している。

〔0018〕励起された増感剤との相互作用はいずれも試薬の添加により検知可能な信号を発生する。欧州特許願第0, 070, 685号明細書(Heller等、I)は非放射性エネルギー移動による均質核酸ハイブリッド形成診断法を記載している。

〔0019〕光放出ポリヌクレオチドハイブリッド形成診断法は欧州特許願第0, 070, 687号明細書(Heller等、II)に記載されている。

〔0020〕欧州特許願第0, 232, 967号明細書(Morrison I)は標的のポリヌクレオチドらんせんに対する検定を行なうための方法と組成物を記載している。その方法は第一および第二のポリヌクレオチドプローブを含む試薬と試料とを接触させるものである。これら第一および第二のプローブは、プローブが互に拘束

〔0021〕される最初の位置およびプローブが標的に結合される第二の位置をとる。これらプローブはそれがこれら二つの位置の一つに存在することを表示する信号を生ずるように相互作用しうる標識部分を含む。

〔0022〕欧州特許願第0, 315, 364号明細書は、液体中の抗原または抗体の存在あるいは濃度を決定する免疫化学検定法を記載している。この検定法は、(イ)第一の標識された抗体または抗原、第二の標識抗体または抗原、および測定しようとする抗原または抗体の3成分複合体をつくり、そして(ロ)抗原物質に結合された相互の接近により高められた第一の標識と第二の標識との間の相互作用により、少なくとも一つの基質の存在下で生ずる信号を検知する、ことからなる。

〔0023〕欧州特許願第0, 229, 943号明細書(Heller等、III)は、ポリヌクレオチドハイブリッド形成検定法に対する蛍光ストークシフトプローブを記載している。

〔0024〕米国特許第4, 226, 993号明細書(Buckler等)は、化学発光性タルヒドラジドで標識した抱合体の合成中間体として有用な免疫機能を与えたタルヒドラジドを記載している。この抱合体は、液体媒質中で配位子あるいはその特異的な結合相手を測定するための特異的結合検定法における試薬として役立つ。

〔0025〕米国特許第4, 380, 580号および第4, 383, 031号明細書(Boguslaski等、IおよびBoguslaski等、II)はそれぞれ不均質および均質化学発光特異的結合検定法を記載している。

〔0026〕米国特許第4, 220, 450(Maggio I)は化学的に誘導される蛍光免疫検定法を記載している。

〔0027〕米国特許第4, 652, 533号明細書(Jolley)は発光性標識を取り込んだ固相免疫検

8

定法を記載している。

〔0028〕米国特許第4, 277, 437号明細書(Maggio II)は化学的に誘導された蛍光免疫検定法を実行するためのキットを記載している。

〔0029〕Heller等(IV)は、「Rapid Detection and Identification of Infectious Agents」(1985), Academic Press, Inc., 245~257頁で、DNAハイブリッド形成方式のための化学発光性および蛍光性プローブを記載している。

〔0030〕Hara等は、Bull. Chem. Soc. Jpn. (1984) 57: 3009~3010で、化学発光試薬として金属錯体化合物を使用する免疫検定法を述べている。

〔0031〕Kuschnir等は、Chemical Communications (1969) 193において、6-アミノフラジン-1, 4-(2H3H)-ジオンカルボニルの光増感化学発光を記載している。

〔0032〕非放射性蛍光留エネルギー移動による核酸ハイブリッド形成の検出法がCardullo等によりProc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1988) 85: 8790~8794に記載されている。

〔0033〕Morrison等は、Analytical Biochemistry (1989) 183: 231~244の中で、相互作用のある蛍光標識および競合的ハイブリッド形成を用いるポリヌクレオチドの溶液相検出法を述べている。

〔0034〕Zomer等は、Analytical Chemical Acta (1989) 227: 11~19の中で、化学発光標識を述べている。

〔0035〕Morrison IIは、Analytical Biochemistry (1988) 174: 101~120の中で、エネルギー移動の時間分割検出法: 理論および免疫検定への応用を述べている。

〔0036〕米国特許第4, 299, 916号明細書(Litman等、I)は免疫検定法においてある表面上での優先的信号生成を記載している。米国特許第4, 233, 402号明細書(Maggio等)はチャンネリングを使用する試薬および方法を記載している。

〔0037〕米国特許第4, 261, 968号明細書(Ullman等、I)は免疫検定法における免疫学的対による蛍光消光を記載している。

〔0038〕米国特許第4, 318, 707号明細書(Litman等、II)は特異的受容体検定法における高分子蛍光消光剤粒子を記載している。

〔0039〕米国特許第4, 650, 770号明細書(Ilu等)は、発光競合タンパク質結合検定法における

50

るエネルギー吸収粒子による消光を記載している。

【0040】米国特許第4, 654, 300号明細書（Zuk等）は蛍光マイクロビーズ消光検定法を記載している。米国特許第4, 174, 384号明細書（U. Iman等, III）は免疫検定法における免疫学的対による蛍光消光を記載している。

【0041】米国特許第4, 193, 983号明細書（U. Iman等, III）は標識したリポソーム粒子組成物およびそれによる免疫検定法を開示している。

【0042】米国特許第4, 199, 559号および第3, 996, 345号明細書（U. Iman等, IVおよびV）は、免疫検定法における免疫学的対による蛍光消光を記載している。

【0043】O' Connell等, C. Linn, Che. M., (1985), 31(9), 1424-1426は、リポソームの水相中にトラップされた染料を有する大きい単層リン脂質小胞を利用するジゴキシンの比色免疫検定法を開示している。

【0044】特許第3, 850, 578号（Mc Connell）、第4, 483, 921号（Yaverbaum）、および第4, 483, 929号明細書（Sokka）は、抗原または抗体が脂質小胞の表面に結合される免疫反応性リポソーム試薬を開示している。

【0045】米国特許第4, 529, 561号（Hunt等）、第4, 522, 803号（Lenk等）および第4, 485, 054号明細書（Mezei等）は脂質小胞を調製する種々な方法を記載している。

【0046】米国特許第4, 311, 712号明細書（Evans等）は凍結乾燥リポソーム混合物の調製法を開示している。米国特許第4, 588, 578号明細書（Fountain等）は単相脂質小胞の製造法および薬物投与系におけるこのようない小胞の使用を開示している。

【0047】米国特許第4, 576, 912号明細書は、多数の発蛍光団を付けたある種の長鎖担体を使用する免疫検定の蛍光レベルを高める方法を開示している。

【0048】米国特許第4, 891, 324号明細書は検定用に発光物質を有する粒子を記載している。植物に有毒なリボソームによるTリンパ球の選択的殺細胞がYemu等（1987），Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 246-250により記述されている。

【0049】Mew等はJ. of Immunology, 130(3): 1473-1477(1983)の中で光免疫療法：腫瘍特異的モノクローナル抗体-ヘマトポルフィリン抱合体を用いる動物腫瘍の治療を開示している。

【0050】小さい単分子の光学顕微鏡による観察がHirschfeld (1976) Applied Optics, 15(12): 3135-3139により論述され、

記載されている。欧州特許第0, 322, 926号明細書（Mc Capra等）は改良化学発光エステル類、チオエステル類、およびアミド類を利用する検定法を記載している。

【0051】欧州特許第0, 352, 713号明細書（Schaap）は1, 2-ジオキセタン類からの化学発光を高める方法と組成物を記載している。

【0052】米国特許第4, 978, 614号明細書（Bronstein）はジオキセタン類の酵素誘導分解を用いる物質検出法を開示している。Bronstein等（米国特許第4, 956, 477号明細書）は1, 2-ジオキセタン類の合成法を述べている。

【0053】Schaap等はWO第90/07511号の中で拘束蛍光物質へのエネルギー移動を通して1, 2-ジオキセタン類からラミネッセンスの増強を記載している。

【0054】米国特許第4, 959, 182号明細書（Schaap）は、1, 2-ジオキセタン類からの化学発光を増大させる方法ならびに組成物を開示している。米国特許第4, 962, 192号（Schaap）および第4, 857, 652号明細書（Schaap）は化学発光を示す1, 2-ジオキセタン化合物を記載している。

【0055】Bronstein等は米国特許第4, 931, 223号明細書で化学発光を示す1, 2-ジオキセタン類を使用する方法を述べている。WO第90/02742号（Edwards等）には安定な水溶性ジオキセタン類の精製法が開示されている。総合多環式環を含む新規な化学発光性1, 2-ジオキセタン類およびそれを用いる検定法がWO第90/00164号（Edwards等）に記載されている。

【0056】WO第89/06226号（Edwards等）は1, 2-ジオキセタン類およびその中間体の合成を記載している。Neckers等は米国特許第4, 315, 998号明細書で重合体に結合させた光増感触媒を述べている。

【0057】ジオキセタン類の酵素誘導分解を使用する物質検出法がWO第88/00695号（Bronstein等）に記載されている。欧州特許第0, 324, 202号明細書（Zomer等）は化学発光標識物としてアクリジニウム化合物を開示している。欧州特許第0, 144, 914号明細書（Aberella等）は、ハイブリッド結合試薬の標識対を用いるハイブリッド形成検定法を記載している。

【0058】欧州特許第0, 401, 001号明細書（Urdea等）は、化学発光性二重トリガー1, 2-ジオキセタン類を記載している。

【0059】

【発明の開示】

課題を解決するための手段

(7)

11

本発明は被検物質の定量法に関する。

【0060】本発明の一面は被検物質を定量する方法であり、本法は被検物質を含むと思われる媒質を（メジウム）を、本質的に準安定な化学種を生ずるように処理することからなる。この化学種は媒質中に拡散し、そして被検物質存在のために前記化学種にごく接近した準安定化学種と反応することのできる媒質中のある物質と選択的に反応することができる。本法は更に前記化学種が物質と反応したかどうかを決定することからなる（その反応が媒質中の被検物質の量を表示する）。

【0061】本発明のもう一つの具体例は、液体媒質中の被検物質に対する検定法の改良である。この検定法は、被検物質を含むと思われる媒質を処理して被検物質の存在と関連した特異的結合対（s b p）複合体を形成せしめ、そしてこの複合体が形成されたかどうかを測定する工程からなる。

【0062】その改良点は媒質を（1）特異的結合対の構成要素と関連する光増感剤と、そして（2）s b p構成要素（s b pメンバー）と関連する化学発光性化合物と一緒にすることからなり、この光増感剤の活性化により化学発光性化合物から放出される光の量は媒質中の被検物質の量と関係づけられる。

【0063】本発明方法のもう一つの具体例は、被検物質が、もし存在するとすれば、光増感剤および化学発光性化合物を非常に接近させるような条件下で、被検物質を含むと思われる媒質を処理することからなる。結果として、光増感剤によりつくり出された一重項酸素が化学発光性化合物を活性化し、これがその後光あるいはルミネッセンスを発する。発生する光の量は媒質中の被検物質の量と関係づけられる。

【0064】もう一つの具体例をあげると、被検物質を測定するための本発明方法は、第一段階として被検物質を含むと思われる媒質、特異的結合対（s b p）の構成要素と関連をもつ光増感剤、および化学発光性化合物を含有してなる懸濁性粒子からなるコンビネーションを提供することからなる。

【0065】この懸濁性粒子はそれに結合した（s b p）構成要素を有する。このコンビネーションを処理して光増感剤を励起させると、その励起状態で光増感剤が酸素を活性化し一重項状態にすることができる。次にコンビネーションを発せられたルミネッセンスの量について調べる。このようなルミネッセンスの量は媒質中の被検物質の量と関係づけられる。

【0066】別法として、化学発光性化合物をs b p構成要素と併合し、懸濁性粒子が光増感剤を含有しつつそれに結合したs b p構成要素を有するようにすることができる。

【0067】もう一つの具体例はコンビネーションを与える被検物質の測定法である。このコンビネーションは被検物質を含むと思われる媒質、第一のs b p構成要素 50

特開平5-180773

12

と併合させた光増感剤、および第二のs b p構成要素と併合させた化学発光性化合物からなる。次に光増感剤を励起させるとこれが酸素を活性化して一重項状態とし、この一重項酸素が光増感剤と接近して存在する化学発光性化合物を活性化する。コンビネーションから発せられたルミネッセンスは被検物質の量と関係づけられる。

【0068】もう一つの具体例は被検物質の測定法である。本法は、被検物質を含むと思われる試料、添加された化学発光性物質および結合したs b p構成要素を有する第一の懸濁性粒子、および粒子がそれに結合されたs b p構成要素を有

【0069】する場合に酸素を活性化してその一重項状態にすることのできる光増感剤を添加した第二の懸濁性粒子を水性媒質中で合わせることからなる。次に、この媒質を照射して酸素の一重項状態をつくり出し、媒質から発せられたルミネッセンスの量を測定する。このようなルミネッセンスの量を媒質中の被検物質の量と関連づける。

【0070】本発明のもう一つの具体例は、化学発光性化合物を添加した懸濁性粒子からなる組成物に関し、この場合、前記粒子はそれに結合したs b p構成要素を有する。更に本組成物は光増感剤を添加した懸濁性粒子からなることができる。

【0071】本発明のもう一つの具体例は（1）化学発光性化合物を有する懸濁性粒子（この場合、粒子はそれに結合されたs b p構成要素を有する）および（2）光増感剤を含む組成物を包装されたコンビネーション中に含有してなるキットに関する。このキットは光増感剤を含有してなる第二の懸濁性粒子（この場合、前記粒子はそれに結合されたs b p構成要素を有する）からなる組成物を更に包含することができる。

【0072】もう一つの具体例をあげると、このキットは（1）第一のs b p構成要素と併合された化学発光性化合物および（2）その励起状態において、第二のs b p構成要素と併合された酸素をその一重項状態に活性化することのできる光増感剤からなる。

【0073】本発明のもう一つの具体例は、（1）被検物質を含むと思われる媒質、（2）光化学的に活性化できる化学発光性化合物と併合させた第一の特異的結合対（s b p）構成要素からなる標識試薬を用意し、第一のs b p構成要素は被検物質または第二のs b p構成要素に結合して被検物質の存在と関係づけられる複合体を形成しうるものであり、前記化学発光性化合物を光化学的に活性化し、そして化学発光性化合物により発生するルミネッセンスの量を検知することからなり、このルミネッセンスの量は媒質中の被検物質の量と関係づけられる。

【0074】もう一つの具体例をあげると、被検物質を測定するための本発明方法は、第一段階として（1）被検物質を含むと思われる媒質、および（2）光化学的に

活性化しうる化学発光性化合物に結合された特異的結合対の構成要素(s b p構成要素)からなる標識試薬を、前記標識試薬を含むs b p構成要素複合体が媒質中の被検物質の存在と関係をもって形成される条件下に、検定媒質中で一緒に合わせることからなる。検定媒

【0076】質を光照射して光化学的に活性化しうる化学発光性化合物を活性化する。検定媒質を発光について調べる。このような信号発光の存在または強度を前記媒質中の被検物質の量と関係づける。化学発光性化合物からのエネルギーがエネルギー受容体を活性化しうる。媒質中にエネルギー受容体を加えておく。

【0077】もう一つの具体例は被検物質の定量法である。この方法は(1)被検物質を含むと思われる媒質、(2)光または一重項酸素と反応したとき化学発光しうる化合物に結合された特異的結合対の第一の構成要素(s b p構成要素)、および(3)第二のs b p構成要素に結合されたエネルギー受容体、あるいは結合するようになる可能性のあるエネルギー受容体からなる不溶化試薬を水性媒質中で同時にあるいは全体的にあるいは部分的に順次に合わせることからなる。標識試薬が媒質中の被検物質の存在

【0078】との関係で形成され、化学発光性化合物からのエネルギーがエネルギー受容体を活性化しうる条件を選ぶ。前記化合物は光あるいは一重項酸素によって活性化される。検定媒質をルミネッセンスについて調べ、その存在あるいは強度を媒質中の被検物質の量と関係づける。

【0079】本発明のもう一つの具体例は被検物質の定量法であり、本法は(イ) (1)被検物質を含むと思われる媒質、(2)一重項酸素と反応したとき化学発光を起こしうる化合物に結合された特異的結合対の第一の構成要素(s b p構成要素)からなる標識試薬、(3)一重項酸素発生剤、および(4)第二のs b p

【0080】構成要素に結合された、あるいは結合するようになる可能性のあるエネルギー受容体からなる試薬を、標識試薬を含むs b p構成要素複合体が媒質中の被検物質の存在との関係で形成されそして化学発光性化合物からのエネルギーがエネルギー受容体を活性化することができる条件下に、検定媒質中で同時にあるいは全体的にあるいは部分的に順次合わせ。(ロ)一重項酸素発生剤を活性化し、そして(ハ)検定媒質を信号について調べ、信号の存在あるいは強度を媒質中の被検物質の量と関係つげることからなる。

【0081】本発明のもう一つの具体例はポリヌクレオチド被検物質の定量法であり、そして本法は(イ)(1)ポリヌクレオチド被検物質を含むと思われる試料および(2)ポリヌクレオチドに結合された光化学的に活性化しうる化学発光性化合物からなる標識試薬(その少なくとも一部は前記ポリヌクレオチド被検物質でハイブリッド形成できる)を、標識試薬が、もし存在する

50 いものは励起一重項状態、例えば一重項酸素、三重項

とすればポリヌクレオチド被検物質とハイブリッド形成する条件下に、検定媒質中で合

【0082】わせ、(ロ)検定媒質を照射して光化学的に活性化しうる化学発光性化合物を活性化し、そして(ハ)媒質のルミネッセンスを測定することからなる。このルミネッセンスの量を試料中の被検物質の量と関係づける。

【0083】本発明のもう一つの具体例はs b p構成要素に結合された光化学的に活性化しうる化学発光性化合物からなる組成物である。本発明のもう一つの具体例はこのような組成物を含有してなるキットである。

【0084】図面の記述

【0085】図1はビタミンB₁₂の検定結果のグラフによる描写である。図2はジゴキシンの検定結果のグラフによる描写である。

【0086】図3は本発明によるHCGの検定結果のグラフによる描写である。図4は本発明による試験結果のグラフによる描写である。

【0087】図5は本発明によるTSIに対する検定結果のグラフによる描写である。図6は図5のグラフによる描写の一部である。

【0088】図7は本発明によるHCGに対する別の検定結果のグラフによる描写である。図8はDNAハイブリッド検出検定の結果のグラフによる描写である。

【0089】図9は合成標的の検出結果のグラフによる描写である。図10は全トリヨードチロニン検定のグラフによる描写である。

【0090】特別な具体例の説明

【0091】本発明は被検物質の定量法に向けられている。本発明の一面は、被検物質を含むと思われる媒質を処理して本質的に準安定化学種をつくることからなる被検物質の定量法である。この化学種は媒質中に拡散することが可能であり、そして被検物質の存在により化学種にごく接近した準安定化学種と反応することのできる媒質中の物質と選択的に反応することが可能である。

【0092】本法は更に化学種が該物質と反応したかどうかを決定することからなり、その反応は媒質中の被検物質の量を指示する。

【0093】一般にこの準安定化学種は励起状態である。準安定化学種は1ミリ秒未満、通常は100ミリ秒未満、更に一般的には10ミリ秒未満の寿命をもつ。この準安定化学種は媒質中に拡散する性質がある、即ちそれがある部位で生成し、その生成部位から他の部位へ移動しそこでエネルギーを移したり、前記部位で分子と反応することができる。

【0094】この準安定化学種はtrans-シクロヘキセン、α-ラクトン、トリメチレンメタンなどの群から生ずるラジカルイオン、ナイトレン、カルベンといった反応性中間体のいずれでもよい。特に関心をもたれて

15

状態、およびジオキセタン類、例えばジオキセタノンおよびジオキセタンジオンである。

【0095】三重項状態は一般に適当な増感剤、例えばビレン、をエネルギー受容体、例えばアントラセンと結合させることによりつくられる。例えば、ジプロモアントラセンは三重項状態をとるエネルギー受容体として作用しうる。三重項状態はそのエネルギーを他の分子に移動させるように進行し、光の発生といった検知可能な光化学的反応を開始する。ジオキセタン類、例えばジオキセタンジオンは活性な分子と一重項酸素または過酸化水素との反応から生ずる。例えば、適当なオキサレートおよび過酸化水素はオキセタンジオンを生成する。

【0096】セイヨウワサビのペルオキシダーゼのような酵素は一般にラジカル陽イオンまたは一重項酸素を発生させることができ、そして後者は同様に準安定であり、他の分子と反応して検知可能な信号を与えることができる。

【0097】特異的結合対複合体の存在は、複合体の一構成要素によって準安定化学種をつくり出すことにより定量できる。このようにするとこの化学種は、該要素が複合体内にないとき前記構成要素と相互作用することなく、複合体の別の構成要素と選択的に相互作用しうる。

【0098】本発明の一面においては、光増感剤およびリガンド、受容体またはポリヌクレオチドからなる組成物が、検定中化学発光性化合物およびリガンド、受容体またはポリヌクレオチドからなる組成物へ結合する。この化学発光性化合物は一重項酸素と反応することができ、そして生じた生成物は光を発して分解する。一重項酸素は、通常は光増感剤の照射により光増感剤によって発生する。

【0099】化学発光性化合物を含有する組成物に結合されない光増感剤によってつくり出された一重項酸素は減衰 ($t_{1/2}$ は水中で約2マイクロ秒である) を受ける前に化学発光性化合物に到達できない。化学発光性化合物を含有する組成物に結合するようになる光増感剤を含有する組成物は一重項酸素をつくり出し、これが化学発光性化合物と反応する。それはこのようにすると光増感剤と化学発光性化合物との間に実現された短い距離をこのようない一重項酸素が存続できるようになるからである。距離の短縮は試料中に被検

【0100】物質が存在する結果起こる。一重項酸素が移動する距離の一部分は有機媒質経由がよく、この媒質中で一重項酸素ははるかに長い寿命、即ち約100マイクロ秒より長い寿命、をもつ。被検物質は光増感剤を含有する組成物と化学発光性化合物を含有する組成物との間の結合を調節しなければならない。通常は、化学発光性化合物および光増感剤の少なくとも一つは表面、とりわけその表面が懸濁性粒子からなる場合の表面と関わりをもつ。

【0101】光増感剤とごく接近して化学発光性化合物 50

16

の一重項酸素励起を含む上記方法は、前記Mc Capraの方法と区別すべきである。Mc Capraの特許出願明細書4頁38-46行に失活形式で行なう検定法が記載されている。Mc Capraの検定法は、増感剤を抱合させた特異的結合物質および被検物質の複合体と特異的に結合しうる反応体を利用して増感剤抱合体-反応体複合体を形成させるものである。失活部分は反応体に付けられる。

【0102】増感剤にきわめて接近させたとき、その失活部分は結合した増感剤の励起の結果として生ずる信号を減少あるいは失活させるか、あるいは励起された増感剤に対する電子またはエネルギーの中間体化学種（即ち、分子状酸素またはロイコ染料）への移動を減少あるいは失活させる。この失活形式で被検物質の存在は減衰しつつあるジオキセタンのルミネッセンスと関係づけられる。このようにして、Mc Capraは上記米国特許第4, 220, 450号および第4, 277, 437号明細書を引用している。

【0103】Mc Capraにより記述されたこの失活検定法形式は励起された増感剤の失活のみを含み、特異的結合構成要素と関連する化学発光性化合物の一重項酸素による活性化を含まない。

【0104】更にまたMc Capra 14頁35~36行には、化学発光性部分からのエネルギー移動でポリヌクレオチドプローブ検定における増感剤を励起させることが記載されている。Mc Capraによるこの記述は完全に本発明から区別される。即ち、本発明は存在する被検物質によって光増感剤と化学発光性化合物とを互にきわめて接近させる方法であり、そこで励起された光増感剤が一重項酸素をつくり出し、次にこれが化学発光性化合物を活性化するのである。

【0105】本発明のもう一つの面においては、光化学的に活性化されて発光性生成物になりうる物質群を標識として使用する。この物質群は特異的結合対の一構成要素と関連し、そしてこの試薬は被検物質の検出のための検定において標識試薬として利用される。光化学的活性化は前記物質群を光で照射するか、あるいは一重項と物質群との反応により達成できる。なるべくは、活性化が一重項酸素による場合増感剤を用いて活性化を促進するのがよい。通常は増感剤が光を吸収し、このようにして形成された励起増感剤が酸素を活性化し、一重項酸素が標識と反応して準安定発光性中間体を与える。

【0106】標識として用いる物質群は増感によってあるいは増感なしに活性化を受ける化学発光性化合物のいずれをも包含し、なるべくは一重項酸素との反応により活性化される物質群である。本発明に係る標識は被検物質を定量するための均質および不均質両方の検定実験計画に使用できる。増感剤およびエネルギー受容体があってもなくても化学発光性化合物を活性化するために化学的試薬を添加する必要がないことが望ましい。

17

【0107】均質実験計画案においては全試薬を合わせ、媒質を照射して化学発光性化合物を活性化する。

【0108】この検定実験計画案においては、成分をコンビネーションとして提供し、増感剤による酸素の活性化の閾値として生じた光は被検物質濃度の閾値であろう。本発明方法は光を発生させるのに媒質を加熱せずに実施できるのが有利な点である。従って、本発明検定法は一定温度で行なうことができる。

【0109】本発明の特別な具体例についての説明を更に続ける前に、幾つかの用語を定義し、詳細に説明することにする。

【0110】被検物質——検出すべき化合物または粗成物。被検物質は特異的結合対(s b p)の一構成要素からなることができ、そしてリガンド(これは一価(モノエピトープ)または多価(ポリエピトープ)で、通常は抗原またはハブテンである)のこともあり、また少なくとも一つの共通したエピトープ部位かデルミナント部位を共有する单一化合物または複数の化合物である。

【0111】被検物質は細胞、例えば細菌の部分、あるいは血液型抗原、例えばA、B、Dなどを有する細胞の部分、あるいはHLA抗原あるいは微生物、例えば細菌、真菌、原虫、またはウイルスのこともある。

【0112】多価リガンド被検物質は通常はポリ(アミノ酸)、即ちポリペプチドおよびタンパク質、多糖類、核酸、およびこれらのコンビネーションである。このようなコンビネーションには細菌、ウイルス、クロモソーム、遺伝子、ミトコンドリア、核、細胞膜などの成分が含まれる。

【0113】大抵の場合、本発明検定法を適用できるポリエピトープリガンド被検物質は、少なくとも約5,000.0、もっと一般的には少なくとも約10,000の分子量を有するであろう。ポリ(アミノ酸)のカテゴリー中対象となるポリ(アミノ酸)は一般に分子量約5,000から5,000,000、更に普通には分子量約20,000から1,000,000であろう。対象となるホルモンのうち、その分子量は約5,000から60,000に及ぶのが普通である。

【0114】多種多様なタンパク質が同様な構造上の特徴をもつタンパク質、特定の生物学的機能を有するタンパク質、特定の微生物、とりわけ病原性微生物に関係あるタンパク質の仲間に属して考慮される。このようなタンパク質には、例えば、免疫グロブリン、シトキン、酵素、ホルモン、癌抗原、栄養マーカー、組織特異性抗原などが含まれる。

【0115】下記は構造により関係づけられるタンパク質の分類である。

プロタミン
ヒストン
アルブミン
グロブリン

硬タンパク質

リンタンパク質

ムコタンパク質

【0116】色素タンパク質

リボタンパク質

核タンパク質

糖タンパク質

T-細胞受容体

プロテオグリカン

HLA

分類に入らないタンパク質、例えばソマトロビン、ブロラクチン、シンシュリン、ペプシン。

【0117】ヒト血漿中に見出される幾つかのタンパク質は臨床的に重要であり、それらには下記のものが含まれる。

【0118】プレアルブミン

アルブミン

 α_1 -リボタンパク質 α_1 -アンチトリプシン α_1 -糖タンパク質

【0119】トランスコルチニン

4.6S-ポストアルブミン

貧トリプトファン α_1 -糖タンパク質 α_1 -X-糖タンパク質

チロキシン結合グロブリン

インターミ-トリプシン-阻害物質

【0120】Gc-グロブリン

(Gc1-1)

(Gc2-1)

(Gc2-2)

【0121】ハプトグロブリン

(Hp1-1)

(Hp2-1)

(Hp2-2)

【0122】セルロプラスミン

コリンエステラーゼ

 α_1 -リボタンパク質(複数)

ミオグロビン

C-反応性タンパク質

【0123】 α_1 -マクログロブリン α_1 -HS-糖タンパク質Zn- α_1 -糖タンパク質 α_1 -ニューラミノ-糖タンパク質

エリトロポイエチン

 β -リボタンパク質

【0124】トランスフェリン

ヘモベキシン

フィブリノゲン

プラスミノゲン

50 β -グリコプロティン

19

β_1 -グリコプロテイン II 免疫グロブリン G
〔0125〕 (IgG) または γ G-グロブリン
分子式:
 $\tau_1 \kappa_1$ または $\tau_1 \lambda_1$
免疫グロブリン A (IgA)
または τ A-グロブリン
分子式:
($\alpha_1 \kappa_1$)_n または ($\alpha_1 \lambda_1$)_n
免疫グロブリン M
(IgM) または τ M-グロブリン
分子式:
($\mu_1 \kappa_1$)_n または ($\mu_1 \lambda_1$)_n
免疫グロブリン D (IgD)
または τ D-グロブリン (τ D)
分子式:
($\delta_1 \kappa_1$)_n または ($\delta_1 \lambda_1$)_n
免疫グロブリン E (IgE)
または τ E-グロブリン (τ E)
分子式:

* ($\epsilon_1 \kappa_1$) または ($\epsilon_1 \lambda_1$)
自由 κ および λ 軽鎖
補体因子:
C' 1
C' 1q
C' 1r
C' 1s
C' 2
C' 3
10 C' 4
 α_1 : D
C' 4
C' 5
C' 6
C' 7
C' 8
C' 9

重要な血液凝固因子には下記のものが含まれる:

【表1】

国際的呼称	名 称
I	フィブリノゲン
II	プロトロンビン
IIa	トロンビン
III	組織トロンボプラスチン
VおよびVI	プロアクセレリン、促進物質グロブリン
VII	プロコンベルチン
VIII	抗血友病グロブリン (AHG)
IX	クリスマス因子血漿トロンボプラスチン成分 (PTC)
X	Stuart-Prower因子、オートプロトロンビン
III	
XI	血漿トロンボプラスチン原形 (PTA)
XII	Hagemann因子
XIII	フィブリントン-安定化因子

〔0126〕 重要なタンパク質ホルモンには下記のもの が含まれる: ベブチドおよびタンパク質ホルモン	(副腎皮質刺激ホルモン)
バラチロイドホルモン (バラトロモン)	チロトロビン 膚胞刺激ホルモン
チロカルシトニン	40 黄体形成ホルモン (間質細胞刺激ホルモン)
インシュリン	ルテオマモトロビックホルモン (ルテオトロビン、プロラクチン)
グルカゴン	ゴナドトロビン (成長性腺刺激ホルモン)
〔0127〕 リラキシン	50 セクレチン (成長ホルモン)
エリトロポイエチン	アングiotensin I および II
メラノトロビン (メラニン細胞刺激ホルモン: インターメジン)	セクレチン ガストリン
ソマトロビン (成長ホルモン)	プラジキニン
〔0128〕 コルチコトロビン	

21

22

ヒド脂盤性ラクトゲン

アルカリ性ホスファターゼ

【0130】シトキン

ミオグロビン

IL I

CPK-MB

IL II

カルシトニン

IL VI

ミエリン塩基性タンパク質

EGF

【0133】神経下垂体から生ずるペプチドホルモン

TNF

オキシトシン

NGF

バソプレッシン

【0131】癌抗原

幹細胞因子 (RF)

PSA

10 【0134】 CRF, LRF, TRF, ソマトトロビン

-RF, GRF, FSH-RF, PIF, MIF

CEA

【0135】 対象となる他の重合体物質はムコ多糖類と
多糖類である。

α-フェトプロテイン

【0136】 代表的微生物には次のものが包含される:

酸ホスファターゼ

【表2】

CA19.9

CA125

【0132】組織特異的抗原

23

Corynebacteria
Corynebacterium diphtheriae
Pneumococci
Diplococcus pneumoniae
Streptococci
Streptococcus pyogenes
Streptococcus salivarius
Staphylococci
Staphylococcus aureus
Staphylococcus albus
Neisseria
Neisseria meningitidis
Neisseria gonorrhoea
Enterobacteriaceae
Escherichia coli
Aerobacter aerogenes
Klebsiella pneumoniae
Salmonella typhosa
Salmonella choleraesuis
Salmonella typhimurium
Shigella dysenteriae
Shigella schmitzii
Shigella arabinotarda
Shigella flexneri
Shigella boydii
Shigella sonnei
他の菌内細菌
Proteus vulgaris
Proteus mirabilis
Proteus morganii
Pseudomonas aeruginosa
Alcaligenes faecalis
Vibrio cholerae
Hemophilus-Bordetella
Hemophilus influenzae, H. ducreyi
Hemophilus hemophilus
Hemophilus aegypticus
Hemophilus parainfluenzae
Bordetella pertussis
Pasteurellae
Pasteurella pestis
Pasteurella tularensis
Brucellae
Brucella melitensis
Brucella abortus
Brucella suis
芽胞性胞子形成性細菌
Bacillus anthracis
Bacillus subtilis
Bacillus megaterium
Bacillus cereus
非芽胞性胞子形成性細菌
Clostridium botulinum
Clostridium tetani
Clostridium perfringens
Clostridium novyi
Clostridium septicum
Clostridium histolyticum

24

Rhizopus oryzae
Rhizopus arrhizua
Phycomycetes
Rhizopus nigricans
Sporotrichum schenckii
Fonsecaea pedrosoi
Fonsecaea compact
Fonsecaea dermatitidis
Cladosporium carrionii
Phialophora verrucosa
Aspergillus nidulans
Madurella mycetomi
Madurella grisea
Allescheria boydii
Phialophora jeanselmei
Microsporum gypseum
Trichophyton
Mentagrophytes
Keratinomyces ajelloi
Microsporum canis
Trichophyton rubrum
Microsporum audouini
Viruses
Adenoviruses
Herpes Viruses
Herpes simplex
Varicella (水痘)

[表3]

40

25

Clostridium tertium
Clostridium bifermentans
Clostridium sporogenes
Mycobacterium
Mycobacterium tuberculosis hominis
Mycobacterium bovis
Mycobacterium avium
Mycobacterium leprae
Mycobacterium paratuberculosis
Actinomyces (真菌様細菌)
Actinomyces Israeli
Actinomyces bovis
Actinomyces naeslundii
Nocardia asteroides
Nocardia brasiliensis
スピロヘータ目
Treponema pallidum *Spirillum minus*
Treponema pertenue *Streptobacillus moniliformis*

ツイバク
Treponema carateum
Borrelia recurrentis
Leptospira intercurrens
Leptospira canicola

Ixynasome
Mycoplasma
Mycoplasma pneumoniae

他の病原性
Encephalitis Virus
Listeria monocytogenes
Encephalitis Virus
Erysipelothrix rhusiopathiae
Streptobacillus moniliformis
Donvania granulomatis
Bartonella bacilliformis
Rickettsia (細菌様寄生虫)
Encephalitis Virus
Rickettsia prowazekii
Encephalitis Virus
Rickettsia mooseri
Rickettsia rickettsii
Rickettsia conori
Rickettsia australis
Rickettsia sibiricus

Rickettsia akari
Rickettsia tsutsugamushi
(HIV)

Lymphotrophic

Rickettsia burnetti
Rickettsia quintana
Chlamydia (分類不可解な寄生虫、
細胞内／ワイルス性)
Chlamydia agent (名名不確実)
基盤
Cryptococcus neoformans
Blastomyces dermatitidis
Hisoplasma capsulatum
Coccidioides immitis
Paracoccidioides brasiliensis
Candida albicans
Aspergillus fumigatus
Mucor corymbifera (*Absidia corymbifera*)

[0137] モノエビトーブリガンド被検物質は、一般に分子量約100から2,000、より普通には分子量125から1,000であろう。これら被検物質の例として薬物、代謝生成物、有害生物防除剤、汚染物質などがあげられる。分析対象となる薬物にアルカロイドが含まれる。アルカロイドの中にはモルヒネ系アルカロイド、例えばモルヒネ、コデイン、ヘロイン、デキストロメトルファン、これらの誘導体および代謝生成物；コカイン系アルカロイド、例えばコカインおよびベンジルエクゴニン、それらの誘導体および代謝生成物；麦角アルカロイド、例えばリセルグ酸のジエチラミド；ステロ

Herpes zoster
(Shingles)
Virus B
Cytomegalovirus
Pox Viruses
Varicella (水痘)
Vaccinia
Poxvirus bovis
Paravaccinia
Molluscum contagiosum
Picornaviruses
Polliovirus
Coxackievirus
Echoviruses
Rhinoviruses
Myxoviruses
Influenza (A, B, S10 C)
Parainfluenza (1-4)
Mumps Virus
Newcastle Disease

Measles Virus
Rinderpest Virus
Canine Distemper Virus
Respiratory Syncytial Virus
Rubella Virus
Arboviruses

Eastern Equine
Western Equine
Sindbis Virus
Chikungunya Virus
Semliki Forest Virus
Hayava Virus
St. Louis

California
Colorado Tick Fever
Virus
Yellow Fever Virus
Dengue Virus
Reoviruses
Reovirus 1-3型
Retroviruses

ヒト免疫欠損ウイルスⅠとⅡ

Virus I & II (HTLV)
Hepatitis
Hepatitis A Virus
Hepatitis B Virus
Hepatitis C Virus
Tumor Viruses
Rauscher Leukemia Virus
Cross Virus
Maloney Leukemia Virus
Human Papilloma Virus

40 イドアルカロイド：イミナゾイルアルカロイド；キナソリンアルカロイド；イソキノリンアルカロイド；キノリナルカロイド；例えばキニーネおよびキニジン；ジテルペンアルカロイド、それらの誘導体および代謝生成物がある。

[0138] 薬物の次の群にはステロイド類、例えば、エストロゲン、アンドロゲン、アンドレオコルチカルステロイド、胆汁酸、強心性配糖体およびアグリコン類、例えば、ジゴキシンおよびジゴキシゲニン、サボニンおよびサボゲニン、それらの誘導体および代謝生成物が含まれる。また、擬ステロイド物質、例えばジエチルス

27

チルペストロールも含まれる。

【0139】薬物の次の群は5から6環員を有するラクタム類、例えばパルビツール酸誘導体、例えばフェノバルビタールおよびセコバルビタール、ジフェニルヒダントイイン、ブリミドン、エトスクシミド、およびそれらの代謝生成物である。

【0140】薬物の次の群は2から3炭素原子を有するアミノアルキルベンゼン類、例えばアンフェタミン；カテコールアミン、例えばエフェドリン、L-ドーパ、エピネフリン、ナルセイン、パパベリン、および上記物質の代謝生成物である。

【0141】薬物の次の群はベンズ複素環化合物で、それらにはオキサゼバム、クロロプロマジン、テグレトル、それらの誘導体および代謝生成物が含まれる。上記複素環はアゼピン類、ジアゼピン類およびフェノチアジン類である。

【0142】薬物の次の群はプリン類、例えばテオフィリン、カフェイン、それらの代謝生成物および誘導体である。薬物の次の群には大麻から誘導されるもの、例えばカンナビノールおよびテトラヒドロカンナビノールが含まれる。

【0143】薬物の次の群はホルモン類、例えばチロキシン、コルチゾル、トリヨードチロニン、テストステロン、エストラジオール、エストロン、プロゲストロン、ポリペチド、例えばアンギオテンシン、LH-RH、および免疫抑制物質、例えばシクロスボリン、FK506、マイコフェノール酸などである。

【0144】薬物の次の群にはビタミン類、例えばA、B、例えばB₁₂、C、D、EおよびK、葉酸、サイアミンが含まれる。薬物の次の群はプロスタグラジン類であり、これらはヒドロキシル化および不飽和の程度と部位によって異なる。

【0145】薬物の次の群は三環式抗うつ剤、例えばイミプラミン、ジスメチルイミプラミン、アミトリプチリン、ノルトリプチリン、プロトリプチリン、トリミプラミン、クロミプラミン、ドキセピン、およびデスマチルドキセピンである。

【0146】薬物の次の群は抗新生物剤、例えばメトトレキセートである。薬物の次の群は抗生素、例えばペニシリン、クロロマイセチン、アクチノマイセチン、テトラサイクリン、テラマイシン、その代謝生成物と誘導体である。

【0147】薬物の次の群はヌクレオシドおよびヌクレオチドで、それらにはATP、NAD、FMN、アデノシン、グアノシン、チミジンおよびシチジン（適当な糖およびリン酸基をもつ）が含まれる。

【0148】薬物の次の群は種々雑多な個々の薬物で、それらにはメタドン、メプロバメート、セロトニン、メペリジン、リドカイン、プロカインアミド、アセチルブロカインアミド、プロプラノロール、グリセオフルビ

50

28

ン、パルブロン酸、チロフェノン、抗ヒスタミン剤、クロラムフェニコール、抗コリン作動薬、例えばアトロピン、それらの代謝生成物および誘導体が含まれる。

【0149】罹患状態に関係する代謝生成物にはスペルミン、ガラクトース、フェニルビルビン酸、およびポルフィリンI型が含まれる。

【0150】薬物の次の群はアミノグリコシド、例えばゲンタマイシン、カナマイシン、トブライマイシン、およびアミカシンである。対象となる有害生物防除剤にはポリハロゲン化ビフェニル、リン酸エステル、チオホスフェート、カルバメート、ポリハロゲン化スルファンアミド、それらの代謝生成物および誘導体がある。

【0151】受容体被検物質に対する分子量は一般に10,000から2×10⁴、更に普通には10,000から10⁴であろう。免疫グロブリン、IgA、IgG、IgEおよびIgMに対する分子量は一般に約160,000から約10⁴を変化するであろう。酵素の分子量は一般に約10,000から1,000,000にわたるであろう。天然の受容体

20 【0152】は多種多様であり、例えばアビシン、DNA、RNA、チロキシン結合グロブリン、チロキシン結合ブレアルブミン、トランスクルチンなどを含めて、分子量は一般に少なくとも約25,000であり、分子量10⁴以上のこともある。

【0153】被検物質という用語は更にポリヌクレオチド被検物質、例えば下に定義されているポリヌクレオチドを包含する。これらにはm-RNA、r-RNA、t-RNA、DNA、DNA-RNA二重らせんなどが含まれる。被検物質という用語はまたポリヌクレオチド結合剤である受容体、例えば制限酵素、活性化物質、抑制因子、ヌクレアーゼ、ポリメラーゼ、ヒストン、修復酵素、化学療法剤などをも包含する。

【0154】被検物質は宿主から得た体液のような試料中に直接見出される分子ことがある。この試料は直接検査することができるが、あるいは被検物質を一層容易に検出できるようにするために前処理することもある。更にまた、対象とする被検物質の証明となる作用因子、例えば対象被検物質に対して相補的な特異的結合対の構成要素（対象被検物質が試料中に存在するときにのみその存在が検出されるもの）を検出することによって定量することもできる。従って、被検物質の証明となる作用因子は、検定で検出される被検物質となる。体液は例えば尿、血液、血

【0155】糞、血清、唾液、精液、大便、痰、脳脊髄液、涙、粘液などでよい。特異的結合対の構成要素（「s b p メンバー」）--

【0156】二つの異なる分子の一方のことで、他の分子の特別な場所の極性組織に特異的に結合し、そのため後者と相補的であると定義される表面上あるいは空洞の中に或る領域を有する分子。特異的結合対の構成要素を

29

指してリガンドおよび受容体（アンチリガンド）とい
う。これらは通常は抗原-抗体のように免疫学的な対の構成要素であるが、他の特異的結合対、例えばビオチン-アビシン、ホルモン-ホルモン受容体、核酸二重らせん、IgG-タンパク質A、ポリヌクレオチド対、例えばDNA-DNA、DNA-RNAなどは免疫学的対ではないけれども、本発明ならびにs b p構成要素の定義に包含される。

【0157】ポリヌクレオチド——自然の状態で約50から500,000個以上のヌクレオチドを有し、また単離された状態で約15から50,000個以上のヌクレオチド、通常は約15から20,000個のヌクレオチド、更にしばしば15から10,000個のヌクレオチドを有する重合体ヌクレオチドである化合物あるいは組成物。ポリヌクレオチドには天然に存在するか合成につくられた精製または未精製の形にある。

【0158】いすれかの給源から得られる核酸、例えばDNA (dsDNAおよびssDNA) およびRNA、通常はDNAが含まれ、t-RNA、m-RNA、r-RNA、ミトコンドリアDNAおよびRNA、葉緑体DNAおよびRNA、DNA-RNAハイブリッド、あるいはその混合物、遺伝子、クロモソーム、プラスミド、生物学的材料、例えば微生物、例えば細菌、酵母、ウイルス、ウイロイド、かび、真菌、植物、動物、ヒトおよびその部分などのゲノムでよい。

【0159】リガンド——それに対する受容体が天然に存在するか、あるいは調製することのできる有機化合物。

【0160】リガンド類縁体——修飾されたリガンド、普通100より大きい分子量を有する有機残基あるいは被検物質類縁体、同様なリガンドと受容体の競合できる。修飾はリガンド類縁体を別の分子の結合する手段を提供する。リガンド類縁体は、

【0161】リガンド類縁体をある中心あるいは標識へつなぐ結合による水素の置き換えにより、リガンドと異なるのが普通であるが、必要ではない。リガンド類縁体はリガンドと同様の仕方で受容体に結合できる。この類縁体は、例えばそのリガンドに対する抗体のイデオタイプに対して指向する抗体でありうる。

【0162】受容体（「アンチリガンド」）——ある分子の特別な場所の極性組織、例えばエピトープ部位またはデルミナント部位、を認識しうる化合物または組成物。代表的受容体には天然に生ずる受容体、例えばチロキシン結合性グロブリン、抗体、酵素、Fabフрагмент、レクチン、核酸、タンパク質A、相補的成分C1qなどが含まれる。

【0163】特異的結合——二つの異なる分子のうちの一つが他の分子を特異的に認識することで、これは別の分子の認識が相当に弱いのと比較して特別に強い。一般に、分子はその表面上にあるいは空洞中に二つの分子間

30

の特異的認識を生ずる領域をもつ。特異的結合の例示は抗体-抗原相互作用、酵素-基質相互作用、ポリヌクレオチド相互作用などである。

【0164】非特異的結合——特別な表面構造に比較的依存しない分子間の非共有結合。非特異的結合は分子間の疎水的相互作用を含めて幾つかの因子から生じうる。

【0165】抗体——別の分子の特別な場所の極性組織に対して特異的に結合し、そのため後者と相補的であると定義される免疫グロブリン。抗体はモノクローナルでも10ポリクローナルでもよく、そしてこの分野でよく知られる技術により、例えば宿主の免疫化と血清の収集（ポリクローナル）により、あるいは連続したハイブリッド細胞系をつくり分泌されたタンパク質（モノクローナル）を収集することにより、あるいは天然抗体の特異的結合に要求されるアミノ酸順序に対して少なくともコード化するヌクレオチド配列あるいはその変異誘発させた変異種をクローニングし、発現させることによりつくりうる。

【0166】抗体は完全な免疫グロブリンあるいはそのフラグメントを包含し、この免疫グロブリンには種々な20分類およびイソタイプ、例えばIgA、IgD、IgE、IgG1、IgG2a、IgG2b、およびIgG3、IgMなどが含まれる。そのフラグメントはFab、F(ab')_n、F(ab')などを含みうる。更に、ある特定分子に対する結合親和性が保たれる限り、必要に応じ免疫グロブリンまたはそれらのフラグメントの集合体、重合体および抱合体を使用できる。

【0167】アルキル——脂肪族炭化水素から1個のH原子を除去することにより誘導される1価の分枝または非分枝残基で、低級アルキルおよび高級アルキルの両方を含む。

【0168】低級アルキル——1から5炭素原子を含むアルキル、例えばメチル、エチル、プロピル、ブチル、イソブチル、イソブチル、ベンチル、イソベンチルなど。

【0169】高級アルキル——6炭素原子より多く、通常は6から20炭素原子を含むアルキル、例えばヘキシル、ヘプチル、オクチルなど。

【0170】アルキリデン——同じ炭素原子から2個の水素原子を取り去ることにより脂肪族炭化水素から誘導される2価有機基、例えばエチリデン。

【0171】アリール——芳香族炭化水素から1個の水素原子を取り除くことにより誘導される1個以上の芳香環、通常は1から4個の芳香環を含む有機基、例えばフェニル（ベンゼンから）、ナフチル（ナフタレンから）など。

【0172】アルアルキル——アリール基が付いたアルキル基をもつ有機基、例えばベンジル、フェネチル、3-フェニルプロピル、1-ナフチルエチルなど。

【0173】アルコキシ——酸素原子によって分子の残りに付くアルキル基、例えばメトキシ、エトキシなど。

31

【0174】アリールオキシ一酸素原子によって分子の残りにつくアリール基、例えばフェノキシ、ナフトキシなど。

【0175】アルアルコキシ一酸素原子によって分子の残りに付くアルアルキル基、例えばベンズオキシ、1-ナフチルエキシなど。

【0176】置換一ある分子の水素原子を他の原子により置き換えることを意味し、これは1個の原子、例えばハロゲンなどのこともあるが、または1から50個の原子（このような原子の原子価を満足するのに必要な要求される水素原子のほか）を有する置換基のような官能基を形成する原子団の一部のこともある。前記原子は炭素、酸素、窒素、硫黄およびリンからなる群から独立して選ばれ、1個以上の金属原子に結合することもある。

【0177】アルキルチオー一硫黄原子によって分子の残りに付くアルキル基、例えばメチルチオ、エチルチオなど。

アリールチオー一硫黄原子によって分子の残りに付くアリール基、例えばフェニルチオ、ナフチルチオなど。

【0178】電子供与性基ーーある分子に結合したとき、その電子供与基が電子不足となり、分子の他の部分と比較して正に帶電する、即ち電子密度を低下させるように分子を分極させることのできる置換基。このような基の例示としてアミン、エーテル、チオエーテル、ホスフィン、ヒドロキシ、オキシアニオン、メルカブタンおよびそれらの陰イオン、スルフィドなどがあげられるが、これらに制限するのではない。

【0179】1から50個の原子（このような原子の原子価を満足するのに必要な水素原子を除く）を有する置換基（これらの原子は炭素、酸素、窒素、硫黄およびリンからなる群から独立して選ばれる）ーー有機残基；この有機残基は残基中の原子の原子価を満足するのに必要な数の水素原子のほかに1から50個の原子を有する。一般に主要な原子は炭素(C)であるが、酸素(O)、窒素(N)、硫黄(S)、リン(P)でもよく、そしてこれらO、N、S、またはPがもし存在するならばこれらは炭素に結合するか、あるいは相互の1個以上にあるいは水素または金属原子に結合して種々な官能基、例えばカルボン酸、アルコール、チオール、カルボキサミド、カルバメート、カルボン酸エステル、スルホン酸、スルホン酸エステル、リン酸、リン酸エステル、尿素、カルバメート、ホスホルアミド、スルホンアミド、エーテル、スルフィド、チオエーテル、オレフィン、アセチレン、アミン、ケトン、アルデヒド、ニトリルなどを形成する。

【0180】このような有機残基または基の代表例としてアルキル、アルキリデン、アリール、アルアルキル、ならびに上記官能基の1個以上で置換されたアルキル、アリールおよびアルアルキルがあるが、これらは例示の

32

ためにあげたのであって制限ではない。

【0181】連結基ーー分子間の共有結合。連結基は結ばれる分子、即ち光増感剤、化学発光性化合物、s b p構成要素あるいは粒子とまたはその一部分と関連する分子の性質によって変化するであろう。通常は存在する官能基あるいは光増感剤や化学発光性化合物に導入される官能基がこれらの物質をs b p構成要素あるいは粒子、例えばリポソームの親油性成分または油滴、ラテックス粒子、ケイ素粒子、金属ソルまたは染料微結晶に結びつけるために使用される。

【0182】大抵の場合、カルボニル官能基、即ちオキソカルボニル、例えばアルデヒドおよび非オキソカルボニル（窒素および硫黄類総合体を含む）、例えばカルボキシ、アミジン、アミデート、チオカルボキシおよびチオノカルボキシ、の両方が使用される。

【0183】オキソの別の官能基には活性ハロゲン、ジアゾ、メルカブト、オレフィン、特別に活性化されたオレフィン、アミノ、ホスホロなどが含まれる。連結基の説明は米国特許第3,817,837号明細書中に見ることができ、参考のためその開示を本明細書中に取り入れている。

【0184】連結基は1本の結合から、1から100個の原子、通常は約1から70原子、なるべくは1から50原子、更に好ましくは1から20原子の連鎖までを変化し、各々は通常炭素、酸素、硫黄、窒素およびリンからなる群から独立して選ばれる。連結基中のヘテロ原子の数は、普通には約0から20個、通常は約1から15個、更に好ましくは2から6個にわたるであろう。鎖中の原子は、1から50原

【0185】子を有する置換基に対して説明した仕方と同様にして水素以外の原子で置換することができる。一般として、特定の連結基の長さは合成の便利さおよびエネルギー受容体、発蛍光团、重金属のような項間交差の解析に対する基の導入が得られるよう任意に選ぶことができる。これら連結基は脂肪族でも芳香族でもよいがジアゾ基については芳香族が通常含まれる。

【0186】ヘテロ原子が存在する場合、酸素は通常オキソまたはオキシとして炭素、硫黄、窒素またはリンに結合して存在し、窒素は通常は二トロ、二トロソまたはアミノとして通常は炭素、酸素、硫黄またはリンに結合して存在し、硫黄は酸素と類似しているが、リンは通常はホスホネートおよびホスフェートモノエステルまたはジエステルとして炭素、硫黄、酸素または窒素に結合するであろう。

【0187】連結基と抱合させるべき分子との間に共有結合をつくる際の共通の官能基はアルキルアミン、アミジン、チオアミド、エーテル、尿素、チオ尿素、グアニジン、アゾ、チオエーテルおよびカルボキシレート、スルホネート、およびホスフェートエステル、アミドおよびチオエステルである。

33

【0188】大抵の場合、光増感剤および化学発光性化合物は非オキソカルボニル基、例えば窒素および硫黄類録体、ホスフェート基、アミノ基、アルキル化剤、例えばハロアルキルまたはトシリアルキル、オキシ(ヒドロキシルまたは硫黄類録体、メルカブト)、オキソカルボニル(例えばアルデヒドまたはケトン)、または活性オレフィン、例えばビニルスルホンあるいは α 、 β -不飽和エステルを有するであろう。これら官能基はアミン基、カルボキシル基、活性オレフィン、アルキル化剤、例えばプロモアセチルにつながるであろう。アミンおよびカルボン酸あるいはその窒素導体またはリン酸がつながると、アミド、アミジンおよびホスホラミドが形成されるであろう。メルカブタンおよび活性化オレフィンが連結されるとチオエーテルが形成されるであろう。メルカブタン

【0189】およびアルキル化剤がつながるとチオエーテルが生ずるであろう。還元的条件下でアルデヒドとアミンがつながるとアルキルアミンが生成されるであろう。カルボン酸またはリン酸とアルコールが結合するとエステルを生ずるであろう。

【0190】親水性あるいは水溶性を付与する基または官能基——これは親水性官能基であり、水による固体の濡れおよび基が結合する化合物の水溶性を増加させる。このような官能基あるいは機能性基は1から50個またはそれ以上の原子を有する置換基でなく、そしてスルホネート、サルフェート、ホスフェート、アミジン、ホスホネート、カルボキシレート。

【0191】ヒドロキシル、とりわけポリオール、アミン、エーテル、アミドなどを含みうる。代表的な官能基はカルボキシアルキル、スルホンオキシアルキル、CO-NHOCH₂COOH、CO-(グルコサミン)、糖、デキストラン、シクロデキストリン、SO₂NHCH₂COOH、SO₂H、CONHCH₂CH₂SO₂H、PO₃H₂、OPO₃H₂、ヒドロキシル、カルボキシル、ケトンおよびそのコンビネーションを包含しうる。上記官能基の大抵のものは、光増感剤または化学発光性化合物をs b p構成要素あるいは支持体に付着させる付着基としても利用できる。

【0192】親油性あるいは脂溶性を付与する基または官能基——これは親油性官能基で、水による表面の濡れおよび基を結合させる化合物の水溶性を減少させる。このような官能基または機能性基は1から50個またはそれ以上の原子、通常は水素またはハロゲンで置換された炭素原子を含むことができ、そしてアルキル、アルキリデン、アリールおよびアルアルキルを包含しうる。

【0193】この親油基または機能性基は通常は少なくとも6炭素原子、更に普通には少なくとも10炭素原子、そしてなるべくは少なくとも12炭素原子、通常は30炭素原子以下を有する1から6個の直鎖または分枝鎖脂肪族基を有するであろう。この脂肪族基は5から6

34

員の環に結合することができ、そして後者は脂環式、複素環式、または芳香族のいずれでもよい。

【0194】光増感剤——通常は光で励起することにより一重項酸素を発生させるための増感剤。光増感剤は活性化性(例えば染料および芳香族化合物)でも化学活性化性(例えば、醇素および金属塩)でもよい。光で励起したとき光増感剤は通常は共有結合した原子からなる化合物であり、多数の共役二重結合または三重結合を有するのが普通である。この化合物は200-1100nm、普通は300-1000nm、なるべくは450-950nmの波長範囲の光を吸収すべきであり、吸収極大における吸光係数は励起波長において500M⁻¹cm⁻¹より大、なるべくは少なくとも5000M⁻¹cm⁻¹、更に好ましくは少なくとも50,000M⁻¹cm⁻¹であるのがよい。

【0195】酸素の存在しない状態で光吸収後に生ずる励起状態の寿命は少なくとも100ナノ秒であるのが普通であり、なるべくは少なくとも1ミリ秒がよい。一般にこの寿命は、媒質により10⁻⁶から10⁻¹Mの範囲内の濃度で通常存在する酸素に対して、エネルギーを移動するのに十分長くなければならない。増感剤の励起状態はその基底状態とは異なるスピニ子数(S)を有するのが普通であり、通常は、これが普通の場合であるが、基底状態が一重項(S=0)であるとき三重項(S=1)であろう。

【0196】増感剤は高い項間交差率を有するのがよい。即ち、増感剤の光励起は少なくとも10%、望ましくは少なくとも40%、なるべくは80%より大きい効率で長寿命状態(通常は三重項)を生ずる。光増感剤は検定条件下せいぜい弱く蛍光性を示すのが普通である(量子収率は通常は0.5未満、なるべくは0.1未満がよい)。

【0197】光により励起させようとする光増感剤は比較的光安定性があり、一重項酸素と効率よく反応しない。大抵の有用な増感剤には幾つかの構造上の特徴がある。大抵の増感剤は堅固な構造、しばしば芳香族構造、に保持された少なくとも1個、しばしば3個以上の共役二重結合または三重結合を有する。

【0198】それらはしばしば項間交差を促進する少なくとも1個の基、例えばカルボニルまたはイミン基または周期表第3列~第6列から選ばれる重原子、とりわけヨウ素または臭素を含むか、あるいは拡張された芳香族構造を有しうる。典型的な増感剤にはアセトン、ベンゾフェノン、9-チオキサントン、エオシン、9,10-ジプロモアントラセン、メチレンブルー、メタローポルフィリン、例えばヘマトポルフィリン、フタロシアニン、クロロフィル、ローズベンガル、バックミンスタークラーレンなど、およびこれら化合物を一層親油性にするかまたは一層親水性にするための、そして(または)例えばs b p構成要素へ付着させるための付着基として

1から50原子の置換基を有する上記化合物の誘導体が包含される。

【0199】本発明検定法に利用できる他の光増感剤の例は、上記性質を有するもので、N. J. Turro、「Molecular Photochemistry」、132頁、W. A. Benjamin, Inc., ニューヨーク、1965に列挙されているものである。

【0200】光増感剤は、それを油滴、リボソーム、ラテックス粒子などに添加すると、親油性成分中の溶解性を確保するため比較的無極性であることが好ましい。

【0201】本発明に役立つ光増感剤は、外部光源による活性化を用いて、あるいは余り好ましくないが、活性化せずに一重項酸素を生成しうる他の物質および組成物を含めることも企図されている。このようにして、例えばモリブデン酸塩(MoO₄²⁻)およびクロロペルオキシダーゼおよびミエロペルオキシダーゼ+臭化物または塩化物イオン(Kanobsky, J. Biol. Chem. (1983) 259: 5596)は過酸化水素から一重項酸素と水への変換を触媒することが示された。

【0202】これら組成物のいずれかを、例えばs bp構成要素を結合させる粒子に含めて、過酸化水素を補助試薬として加え、クロロペルオキシダーゼを表面に結合させそしてモリブデン酸塩をリボソームの水相中に添加するという検定法に使用できる。また光増感剤として本当の増感剤ではないが熱、光または化学的活性化により励起させたとき一重項酸素の分子を放出する化合物があることも本発明の範囲内に含められる。

【0203】この部類の化合物のうち最もよく知られたものはエンドペルオキシド、例えば1, 4-ビスカルボキシエチル-1, 4-ナフタレンエンドペルオキシド、9, 10-ジフェニルアントラセニ-9, 10-エンドペルオキシドおよび5, 6, 11, 12-テトラフェニルナフタレン-5, 12-エンドペルオキシドが含まれる。これら化合物の加热あるいはこれらによる直接の光吸収は一重項酸素を放出する。

【0204】支持体あるいは表面—多孔質または非多孔質の水不溶性材料からなる表面。この表面は幾つかの形状、例えばストリップ、棒、粒子(ピースを含む)などのいずれか一つをとりうる。この表面は親水性でもよいし、あるいは親水性を与えることもでき、そして無機粉末、例えばシリカ、硫酸マグネシウム、およびアルミニウム；天然重合体材料、とりわけセルロース性材料およびセルロースから誘導される材料、例えば纖維含有紙類、例えば滤紙、クロマトグラフィー用紙など；合成または変性した天然産生重合体、例えばニトロセルロース、酢酸セルロース、ポリ(塩化ビニル)、ポリアクリルアミド、架橋デキストラン、アガロース、ポリアクリレー

ト、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ(4-メチルブテン)、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリ(エチレンテレフタレート)、ナイロン、ポリ(塩化ビニル)などが包含される。これらはそれ自身を使用するか、あるいは他の材料、Bioglassとして入手できるガラス、セラミックス、金属などと共に使用される。

【0205】天然または合成の樹脂体、例えばリボソーム、リン脂質小胞、および細胞体も使用できる。

【0206】支持体あるいは表面へのs bp構成要素の結合は、文献で普通入手できるよく知られた技術により達成できる。例えば、「Immobilized Enzymes」、Ichiro Chibata, Hans Listed Press, ニューヨーク(1978)およびCuatrecasas, J. Biol. Chem., 245: 3059 (1970) 参照。

【0207】表面は通常は多官能性か、多官能性にすることができるか、あるいは特異的または非特異的共有または非共有相互作用を通して、オリゴスクレオチド、s bp構成要素、光増感剤、および(または)化学発光性化合物を結合しうるかであろう。多種多様な官能基を利用でき、あるいは取り入れることができる。官能基の例としてカルボン酸、アルdehyド、アミノ基、シアノ基、エチレン基、ヒドロキシル基、メルカプト基などがあげられる。多種多様な化合物を表面に連結させる方法は公知であり、文献に豊富に例示されている。

【0208】例えばCuatrecasas, J. Biol. Chem. 245, 3059 (1970) 参照。オリゴスクレオチドまたはs bp構成要素に対する連結基の長さは結合される化合物の性質、結合される化合物と特異的結合性をもつ表面との間の距離の影響などにより広く変化しうる。

【0209】粒子—少なくとも約20nmそして約20ミクロン以下、通常は少なくとも約40nmそして約10ミクロン未満、なるべくは直径約0.10から2.0ミクロン、そして通常は1ピコリットル未満の体積を有する粒子。この粒子は有機または無機性、膨潤可能または非膨潤性、多孔性または非多孔性で、密度はいずれでもよいが、なるべくは水に近似する一般に約0.7から約1.5g/mlの密度がよく、なるべくは水に懸濁可能で、透明、部分的に透明、または不透明な材料から構成できる。

【0210】粒子は電荷をもつこともないこともあるが、もしされらが帶電しているときはなるべく負に帯電するのがよい。粒子は固体(例えば、重合体、金属、ガラス、有機および無機物、例えば磁性物質、塩およびけいそう)、油滴(例えば炭化水素、過フッ化炭化水素、液体シリコーン)、または小胞(例えば、合成、例えばリン脂質または天然、例えば細胞およびオルガネル)のいずれでもよい。

37

【0211】粒子はラテックス粒子または有機または無機重合体から構成された他の粒子；脂質二重層、例えばリボソーム、リン脂質小胞；油滴；ケイ素粒子；金属ゾル；細胞；および染料微結晶のいずれでもよい。

【0212】有機粒子は通常は重合体（付加重合体か縮合重合体のいずれか）であり、検定媒質中に容易に分散しうるものである。有機粒子はまたその表面に直接か間接的にs b p構成要素を結合するように、また光増感剤あるいは化学発光性化合物をその表面に結合するよう、あるいはその体積内に取り込むように吸着性をもつかそのように機能化しうるであろう。

【0213】これら粒子は天然に生ずる材料、合成的に修飾された天然材料、および合成材料から誘導できる。天然または合成集束体、例えば脂質二重層、例えばリボソームおよび非リン脂質小胞が特によい。特に関心をもたれる有機重合体には多糖類、とりわけ架橋多糖類、例えばアガロース（Sephadoseとして入手可能）、デキストラン（SephadexおよびSephacrylとして入手可能）、セルロース、デンプンなど；付加重合体、例えばポリスチレン、ポリacrylicアミド、アクリレートおよびメタクリレートの誘導体のホモポリマーおよび共重合体、とりわけヒドロゲルを含めて離隔ヒドロキシ官能基を有するエステル類およびアミド類などがある。無機重合体はシリコーン、ガラス（Bologlassとして入手可能）などを包含する。ゾルには金、セレン、および他の金属が含まれる。

【0214】粒子はまた光増感剤としても作用しうる分散水不溶性染料、例えばポルフィリン、フタロシアニンなどでもよい。粒子はまたけいそう、細胞、ウィルス粒子、マグネットソーム、細胞核なども包含する。

【0215】粒子が市販されているものである場合、その粒径はより大きい粒子を粉碎、超音波処理、かきませなどといった機械的手段によって小さい粒子に破壊することにより変えることができる。

【0216】粒子は多官能性または多官能性化することができます。あるいはs b p構成要素、光増感剤、または化学発光性化合物に対し特異的または非特異的共有または非共有相互作用を通して結合させることができるのが普通である。多種多様な官能基を利用でき、あるいは取り入れることができる。典型的な官能基にはカルボン酸、アルデヒド、アミノ基、シアノ基、エチレン基、ヒドロキシル基、メルカブト基などが含まれる。

【0217】粒子に対してs b p構成要素、化学発光性化合物または光増感剤を共有結合によって付ける方法を用いる場合、その連結の仕方は公知であり、文献に詳細に例示されている。例えば、Cautrecasas, J. Biol. Chem., 245: 3059 (1970) 参照。連結基の長さは連結される化合物の性質、粒子の性質、連結される化合物と粒子との間の距離がs b p構成要素の結合に及ぼす影響および被検物質な

38

どによって広く変化しうる。

【0218】光増感剤および（または）化学発光性化合物は粒子の表面に溶けるかまたは表面に対し非共有結合的に結合するように選ぶことができる。この場合これら化合物は、粒子から解離する能力を減少させそれによつて両方の化合物を同じ粒子と関連させるように、なるべくは疎水性であるのがよい。

【0219】これは多分光増感剤か化学発光性化合物のいずれかと関連させる唯一の組成の粒子を利用するか、または光増感剤と一つの型の粒子との会合をまた化学発光性化合物と他の型の粒子との会合を有利にするように組成の異なる二つの型の粒子を用いることにより更に減らすことができるであろう。

【0220】各粒子と関連する光増感剤または化学発光性分子の数は平均して通常は少なくとも1であり、粒子がすっかり光増感剤または化学発光剤分子から成り立つ程十分高くてよい。特に適当な分子数は検定で信号対パックグラウンドを最高にするように経験的に選ばれるであろう。

【0221】ある場合には、多数の異なる光増感剤分子を粒子と共同させることによりこれをなし遂げるのが最も良い。通常は粒子中の光増感剤または化学発光性化合物対s b p構成要素の比は少なくとも1とすべきであるが、なるべくは少なくとも100対1、最も好ましくは1,000対1以上である。

【0222】油滴——これは乳化剤で被覆され安定化された親油性化合物からなる液体粒子で、前記乳化剤は、例えばリン脂質、スフィンゴミエリン、アルブミンなどといった両親性分子である。

【0223】リン脂質は脂肪族ポリオールの脂肪酸カルボン酸エステルを基本とし、少なくとも1個のヒドロキシル基は約8から36、更に普通には約10から20炭素原子のカルボン酸エステルで置換される。前記カルボン酸エステルはエチレン性不飽和部位0から3個、もっと普通な場合は0から1個を有し、そして少なくとも1個、通常はただ1個だけのヒドロキシル基がホスフェートで置換されてリン酸エステルを形成する。このホスフェート基は、一般にヒドロキシルまたはアミノ基を有する二官能性あるいは多官能性の小さい脂肪族化合物で更に置換されることがある。

【0224】油滴は従来の手順に従い適当な親油性化合物を陰イオン性、陽イオン性または非イオン性の界面活性剤と合わせ（この場合、界面活性剤は混合物の約0.1から5、更に普通には約0.1から2重量%の量で存在する）そして混合物を水性媒質中でかきませる、例えば超音波処理あるいは渦巻きを起こすことにより調製できる。代表的な親油性化合物には炭化水素油、過ハロゲン化炭化水素、例えば過フッ化炭化水素、アルキルフタレート、トリアルキルホスフェート、トリグリセリドなどが含まれる。

【0225】s b p構成要素は油滴表面に吸着させるか、あるいは油滴表面の成分に直接または間接的に結合させるのが普通である。s b p構成要素は液体粒子の調製中または調製後のいずれかで液滴中に添加できる。s b p構成要素は、粒子表面上に存在する分子の約0.5から100、更に普通には1から90、しばしば約5から80そしてなるべくは約50から100モルパーセントの量で存在するのが普通である。

【0226】油滴を安定化するために使用できる両親媒性化合物の一覧を次に示すが、これは例示のためであつてこれらに制限するのではない：ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ジミリストイルホスファチジルコリン、卵ホスファチジルコリン、ジアルミトイルホスファチジルコリン、ホスファチジン酸、カルジョリビン、レシチン、ガラクトセレブロンド、スフィンゴミエリン、ジセチルホスフェート、ホスファチジルイノシトール、2-トリヘキサデシルアンモニウムエチルアミン、1, 3-ビス(オクタデシルホスフェート)プロパンオール、ステアロイルオキシエチレンホスフェート、リン脂質、ジアルキルホスフェート、硫酸ドデシルナトリウム、陽イオン性洗浄剤、陰イオン性洗浄剤、タンパク質、例えばアルブミン、非イオン性洗浄剤など。

【0227】親油性基を有しそして以前に記述されたことのある他の化合物も使用できる。大抵の場合これら化合物はアルキルベンゼン類であり、そして直鎖または分枝鎖の6から20炭素原子を有するアルキル基（通常はアルキル基の混合体）を有し、またカルボキシル基、ヒドロキシル基、ポリオキシアルキレン基（2から3炭素原子のアルキレン）、カルボン酸基、スルホン酸基、またはアミノ基を有する。

【0228】脂肪族脂肪酸を使用でき、そしてこのものは約10から36、更に普通には約12から20炭素原子のものが普通である。また、脂肪酸に対して示した炭素原子数の制限を有する脂肪アルコール、同様な炭素数制限をもつ脂肪アミンおよび種々なステロイドも使用できる。

【0229】油滴は過フッ化炭化水素またはシリコーン油（シリコーン粒子）からなることができる。このような油滴は米国特許第4, 634, 681号および第4, 619, 904号明細書中でGlaeverにより述べられている（その開示をそっくり本明細書中に取り入れている）。これら油滴は過フッ化炭化水素またはシリコーン油を水相中に分散させることによりつくられる。

【0230】油滴は少量の選ばれた油（一般にこのような油は市販されている）を大量の水相と共に容器に入れることにより調製される。

【0231】この液体系をかきませて乳化を起こさせ次に遠心する。均一相を取り除き、残留油滴を緩衝した水性媒質中に再浮遊させる。油滴を使用する前に上記の遙

心およびデカンテーション工程を一回以上繰り返すことができる。

【0232】s b p構成要素は幾つかの方法で小滴に結合させることができる。Glaeverにより説明されている通り、特定のs b p構成要素、とりわけタンパク質性s b p構成要素は乳化工程に先立ち、またはその後で過剰のs b p構成要素を水性媒質中に導入することにより小滴上に被覆することができる。過剰のs b p構成要素を除去するため洗浄工程が望ましい。油を官能基化することによりs b p構成要素をつなぐための前記官能性が導入される。

【0233】このような官能基は油滴を光増感剤または化学発光性化合物に連結させるために使用することができる。他方、光増感剤または化学発光性化合物は油滴の油相中に可溶であるように選ばれることが多く、その場合には共有結合されない。油滴が過フッ化炭化水素であるとき、フッ素化された光増感剤または化学発光性化合物は、対応する未フッ素化誘導体より溶け易い場合が多い。

【0234】Glaeverにより記述された他の油滴も本発明に使用できる。

【0235】リボソーム——ほぼ球形をした微小ベシクル。これは本発明に用いるのに特に適当な材料の一つである。リボソームは少なくとも約20nmそして約20ミクロン以下、通常は少なくとも約40nmで約10ミクロン未満の直径をもつ。リボソームの直径は沈降あるいは浮上を制限するよう約2ミクロン未満であるのがよい。

【0236】リボソームの外殻はある体積の水または水溶液を包囲する両親媒性二重層からなる。一つより多くの二重層をもつリボソームは多重膜小胞と呼ばれる。唯一の二重層をもつリボソームは單一膜小胞と呼ばれる。親油性光増感剤または化学発光性化合物を使用する場合には、單一膜小胞よりも大量のこれら物質を取り込む能力があるので、多重膜小胞の方が本発明にとって好ましい。両親媒性二重膜はしばしばリン脂質からなる。

【0237】本発明方法に利用できる粒子を調製するのに用いられるリン脂質はレシチンを含めて天然膜に見出されるなどのリン脂質でもまたはリン脂質混合物でもよく、あるいは飽和または不饱和1, 2-炭素または2, 4-炭素直鎖脂肪酸の合成グリセリルホスフェートジエステルでもよく、後者の場合、ホスフェートはモノエステルとして、あるいは極性アルコール、例えばエタノールアミン、コリン、イノシトール、セリン、グリセリンなどのエステルとして存在しうる。

【0238】特に適当なリン脂質には下記の化合物が含まれる：L-α-パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン(POPC)、パルミトイルオレオイルホスファチジルグリセリン(POPG)、L-α-ジオレオイルホスファチジルグリセリン、L-α-(ジオレオイ

41

ル) -ホスファチジルエタノールアミン(DOPE)およびL- α (ジオレオイル)-ホスファチジル β - (4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシアミド)エタノール(DOPE-MCC)。

【0239】二重層中のリン脂質はコレステロールで補うことができ、また他の両親媒性化合物で置き換えることができる。後者の化合物は通常は帶電した極性ヘッド基と通常は2本の直線炭化水素鎖からなる疎水性の部分を有するものである。

【0240】このような置き換え化合物の例にはジアルキルホスフェート、ジアルコキシプロビルホスフェート(これらアルキル基は12~20炭素原子の直鎖をもつ)、N-(2,3-ジ(9-(Z)-オクターデセニルオキシ))-1-プロビル-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(米国特許第4,897,355号明細書、1990年1月30日発行、に開示されている。これは参考として本明細書中に取り入れている)、スフィンゴミエリン、カルジオリビンなどが含まれる。

【0241】本発明方法に利用されるリポソームは懸濁系を安定化しつつ自然凝集を防止するため高い負電荷密度をもつ。

【0242】本発明方法に用いるためにはリポソームはs bp構成要素に結合できねばならず、また水相または非水相いずれかと関連した光増感剤または化学発光性化合物を含むことができなければならない。本発明方法に利用されるリポソームは脂質小胞の外面に結合したs bp構成要素を有するのが普通である。

【0243】リポソームは乾燥リン脂質あるいはリン脂質に代る物質の水溶液中の水和および機械的分散を含めて種々な方法により調製できる。この方法でつくられたりポソームは種々な大きさと組成と挙動を有する。機械的に分散したりポソームの挙動の不均一性および不一致を減らす一つの方法は超音波処理によるものである。このような方法はリポソームの平均寸法を減少させる。

【0244】別法としてリポソーム製造中の最終工程として押し出しを使用できる。米国特許第4,529,561号明細書は寸法の均一性を改善するため均一な細孔寸法の膜を通して加圧下にリポソームを押し出す方法を開示している。

【0245】脂質二重層中に溶けた疎水性あるいは両親媒性の光増感剤または化学発光性化合物を含有するリポソームの製造は、Olsen等、Biochemical et Biophysica Acta, 557(9), 1979により記述された方法を含めて種々な方法で実施できる。簡単に言えば、有機溶媒、例えばクロロホルム中に適当な化合物を含む脂質の混合物を、ガラス容器壁上に薄膜となるまで乾燥させる。この脂質の膜を適当な緩衝液中で振盪または渦巻きを起こすことにより水和する。

42

【0246】その後脂質懸濁系を連続的に小さくした細孔寸法(例えば、2.0、1.0、0.8、0.6、0.4および0.2ミクロン)を有する一連のポリカーボネートフィルター膜を通して押し出す。これらフィルターのいずれか、とりわけ最小のフィルターを通して繰り返し通過することが望ましい。このリポソームは、例えばゲル濾過により、例えばSephacryl S-1000のカラムを通過することにより精製できる。

【0247】カラムを緩衝液で溶離しリポソームを集めることができる。冷所に貯蔵すると、この方法によりつくられたりポソームの保存寿命を延長できる。別法として、リポソーム調製後の懸濁液に光増感剤または化学発光性化合物を添加することができる。

【0248】油滴およびリポソームの標識化はしばしば例えば脂質二重層からなる分子にチオールまたはマレイミドまたはビオチン基の封入を含むであろう。次に光増感剤、化学発光性分子またはs bp構成要素を粒子とこれら物質の一つとの反応により表面へ結合させることができる。即ち、それぞれスルフヒドリル反応性試薬、スルフヒドリル基、またはアビジンに結合される。スルフヒドリル反応性基にはアルキル化試薬、例えばプロモアセトアミドおよびマレイミドが含まれる。

【0249】s bp構成要素は弱い疎水性相互作用によりリポソーム粒子の表面に引かれことがあるが、しかしこのような相互作用はインキュベーションおよび洗浄中に出会うせん断力に耐えるには一般に十分でない。前に示したように、例えばDOPE-MCCを用いて官能基化したりポソーム粒子をメルカプタン基で官能基化した選ばれたs bp構成要素と合わせることによって、前記リポソームへs bp構成要素を共有結合させが好ましい。

【0250】例えば、もし s bp構成要素が抗体であるならば、それをS-アセチル-メルカプトコハク酸無水物(SAMSA)と反応させ、そして加水分解するとスルフヒドリルで修飾された抗体が得られる。

【0251】ラテックス粒子——「ラテックス」とは水に懸濁しうる水に溶けない粒状重合体物質で、通常は直径20nmから20mm、更に好ましくは直径100から1000nmの粒径を有するものを意味する。ラテックスはしばしば置換ポリエチレン、例えばポリスチレン-ブタジエン、ポリアクリラミド-ポリスチレン、アミノ基をもつポリスチレン、ポリーアクリル酸、ポリメタクリル酸、アクリロニトリル-ブタジエン、スチレン共重合体、ポリ酢酸ビニル-アクリレート、ポリビニルビリジン、塩化ビニルアクリレート共重合体などの場合が多い。スチレンおよびカルボキシル化スチレンまたは他の活性基、例えばアミノ、ヒドロキシル、ハロなどで官能基化したスチレンの非架橋重合体が特に適当である。置換スチレンとジエン類、例えばブタジエンとの共50重合体がしばしば使用される。

43

【0252】光増感剤または化学発光性化合物と本発明方法に用いられるラテックス粒子との結合は、重合による粒子の形成中に添加するものであるが、普通には粒子中への非共有結合的溶解による既成粒子中への取り込みである。通常は化学発光性化合物または増感剤の溶液が使用される。利用しうる溶媒には、アルコール類、例えばエタノール、エチレングリコールおよびベンジルアルコール；アミド類、例えばジメチルホルムアミド、ホルムアミド、アセトアミドおよびテトラメチル尿

【0253】素など；スルホキシド類、例えばジメチルスルホキシドおよびスルホラン；およびエーテル類、例えばカルピトール、エチルカルピトール、ジメトキシエタンなど、および水が含まれる。粒子が溶解しない高沸点溶媒の使用は高温度の使用を可能にし、粒子中への化合物の溶解を促進するので特に適当である。溶媒は単独で用いても組み合わせて用いてもよい。

【0254】光増感剤を添加するために特に適した溶媒は、それらが本来備えている性質の故に、あるいは粒子に溶けない水のような溶媒中にそれらが溶解しうる能力のため溶媒を後に粒子から除去できる故に、光増感剤の三重項励起状態を失活させないものである。芳香族溶媒が特によく、一般に粒子に溶ける溶媒がよい。粒子中に化学発光性化合物を添加するための溶媒は、それらが本来備えている性質の故に、あるいは粒子から除去できる能力の故に、ルミネセンスを妨害しない溶媒を選ぶべきである。この場合にもしばしば芳香族溶媒が好ましい。典型的な芳香族溶媒にはジブチルフタレート、ベンゾニトリル、ナフトニトリル、ジオクチルテレフタレート、ジクロロベンゼン、ジフェニルエーテル、ジメトキシベンゼンなどが含まれる。

【0255】光増感剤または化学発光性化合物を粒子に共有結合しようとする場合は別として、通常は電子的に中性の光増感剤または化学発光性化合物を用いるのがよい。選ばれる液体媒質は重合ビーズを粘着性の現われる点まで軟化しないことが好ましい。特に適当な技術は、光増感剤または化学発光性化合物が少なくとも限られた溶解度しかもたない液体媒質中に選ばれたラテックス粒子を懸濁させることからなる。

【0256】この液体媒質中の光増感剤および化学発光性化合物の濃度は一重項酸素の生成効率が最高で、また媒質中の化学発光性化合物からの発光の量子収率が最高である粒子が得られるように選ぶのがよいが、濃厚でない溶液も時としては好ましいであろう。溶媒中の粒子のひずみあるいは溶解は粒子が不溶である混和性共溶媒を加えることにより防止できる。

【0257】一般に、この手順の間に用いる温度は、光増感剤標識粒子の一重項酸素形成能力および化学発光性化合物粒子の量子収率を最大にするように選ばれるが、ただし粒子がその選ばれた温度において融解あるいは凝集すべきでないことを条件とする。通常は高温が使用さ

44

れる。この手順に対する温度は一般に20℃から200℃、更に普通には50℃から170℃にわたるであろう。室温ではほとんど不溶性の若干の化合物は、高温では低分子量アルコール、例えばエタノールおよびエチレングリコールなどに可溶である。カルボキシル化変性ラテックス粒子はこのような温度で低分子量アルコールに耐えることが示された。

【0258】s b p構成要素はラテックス粒子の表面に物理的に吸着させることができ、あるいは粒子に共有結合させることもできる。s b p構成要素がラテックス粒子の表面に極めて弱くしか結合しない場合、その結合はある場合には、インキュベーションおよび洗浄中に出会う粒子対粒子せん断力に耐えることができないかもしれない。それ故に、吸着を最小にする条件下でs b p構成要素をラテックス粒子に共有結合させることが好ましい。これはラテックスの表面を化学的に活性化することにより達成できる。

【0259】例えば表面カルボキシル基のN-ヒドロキシスクシンイミドエステルをつくり、粒子表面への検定成分の非特異的結合を減らすようにこの活性化された粒子を次にアミノ基をもつリンカー（エステル基と反応する）と接触させるかあるいはアミノ基をもつs b p構成要素と直接接触させる。このリンカーは検定成分が粒子表面に非特異的に結合するのを減らすように選ぶのが普通であり、ラテックス粒子への付着およびs b p構成要素への付着の両方に適した官能基をもつことが好ましい。適当な物質にはマレイミド化したアミノデキストラノン（MAD）、ポリリジン、アミノ糖類などが含まれる。MADはHubert等、Proc. Natl. Acad. Sci., 75 (7), 3143, 1978記載のようにして調製できる。

【0260】一つの方法を示すと、先ずMADは、水溶性カルボジイミド、例えば1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミドを用いてカルボキシル含有ラテックス粒子に付ける。この被覆粒子を次に試薬中で平衡化させ非特異的結合を防ぐ。このような試薬の例として、タンパク質、例えばウシアーグロブリン（BGG）、および洗浄剤、例えばTween 20、Triton X-100などがあげられる。

【0261】スルフヒドリル基を有するか、またはスルフヒドリル基を導入するように適当に修飾したs b p構成要素を次に粒子の懸濁液へ添加すると、s b p構成要素と粒子上のMADとの間に共有結合が形成される。次に過剰の未反応s b p構成要素を洗浄により除去する。

【0262】金属ゾルーこれは重金属、即ちIB族金属のような20より大きい原子番号を有する金属、例えば金または銀、あるいはカルコゲン、例えばセレンまたはテルルからなる粒子である。

【0263】金属ゾル粒子は、例えばLeuverin 50 gにより米国特許第4,313,734号明細書の中で

45

述べられている（その開示をそのまま参考のため本明細書中に取り入れている）。このようなゾルには金属、金属化合物、あるいは金属か金属化合物で被覆した重合体核のコロイド状水性分散系が含まれる。

【0264】金属ゾルは金属または金属化合物、例えば金属酸化物、金属水酸化物および金属塩、のゾルでもよいし、あるいは金属か金属化合物で被覆された重合体核のものでもよい。このような金属の例は白金、金、銀、水銀、鉛、パラジウムおよび銅であり、このような金属化合物の例はヨウ化銀、臭化銀、銅の含水酸化物、酸化鉄、水酸化鉄または鉄の含水酸化物、アルミニウムの水酸化物または含水酸化物、クロムの水酸化物または含水酸化物、酸化バナジウム、硫化ヒ素、水酸化マンガン、硫化鉛、硫化水銀、硫酸バリウム、および二酸化チタンである。一般に、有用な金属または金属化合物は公知の技術によって容易に実証できる。

【0265】上記金属または金属化合物で被覆された重合体核からなる分散粒子からなるゾルを使用することも時として有利である。これら粒子は純粋な金属または金属化合物の分散相と同様な性質をもっているが、大きさ、密度および金属接触は最適となるように兼有させることができる。

【0266】金属ゾル粒子は公知の多数の方法で調製できる。例えば、金ゾルの調製に *Leuvering* は G. Frens による *Nature Physical Science* 241, 20 (1973) 中の記事を引用している。

【0267】金属ゾル粒子は s b p 構成要素または光増感剤または化学発光性化合物への連結のため前述したような種々な官能基を含むように修飾できる。例えば、重合体結合剤を使用することによって例えば多くの重金属に強く結合するチオール基を含む重合体の粒子を被覆することができ、あるいは、例えば磁性粒子を被覆するため Advanced Magnetics により EPO 特許願第 84400952、2 号明細書中に述べられた金属粒子とトリアルコキシアミノアルキルシランとの反応による重合体被覆物を結合し形成しうるシリル化剤を用いて前記粒子を被覆できる。

【0268】染料微結晶——純粋または混合の固体水不溶性染料、なるべくは前記光増感剤として役立ちうる染料の微小結晶。本発明方法に有用な染料微結晶は粒径 2 0 nm から 2 0 μm をもつ。

【0269】染料微結晶をつくる一つの方法が米国特許第 4, 373, 932 号明細書 (Gribnau 等) に記載されており、その開示をそのまま参考のため本明細書中に取り入れている。Gribnau はコロイド状染料粒子および疎水性染料または顔料の水性分散系を説明しており、これらは免疫学的に反応性のある成分を直接または間接的に付着できる。

【0270】一般に、染料粒子は染料を水に分散し次に

46

遠心することによりつくられる。染料ペレッドが得られ、次にガラスピーズを加えた水に再懸濁させる。この懸濁系を室温で数日間回転させる。液体をテカンーションし、遠心し、液体の吸引後に染料粒子を得る。

【0271】染料微結晶のもう一つの製造法は、水と混和しうる溶媒中に溶かした染料の溶液を水へゆっくり加えることによる。もう一つの方法は固形染料の水懸濁液の超音波処理による方法である。

【0272】染料粒子への s b p 構成要素の結合は、直 10 接または間接的な吸着あるいは共有化学結合による付着により達成できる。後者は被覆物質および染料いずれかの中に適當な官能基が存在することにより支配される。例えば、官能基は、ジアゾ化した芳香族アミノ基および望む官能基を含む化合物を染料のフェノール性基またはアニリノ基にカップリングすることにより、染料微結晶の表面上に導入できる。

【0273】染料がカルボキシル基を有する場合、染料微結晶をカルボジイミドにより活性化し、第一級アミノ成分にカップリングできる。脂肪族第一級アミノ基およびヒドロキシル基は、例えば臭化シアンあるいはハロゲン置換ジーまたはトリーアジン類により活性化し、その後、第一級アミノ成分との結合あるいは、例えば-S H、または-OH または基を含む成分との結合を行なうことができる。二官能性反応性化合物を使用することもできる。

【0274】例えば、染料の第一級アミノ成分と s b p 構成要素との相互カップリングにグルタルアルデヒドを使用し、そしてチオール基を含む成分への第一級アミノ成分のカップリングに、例えばヘテロ-ニ官能性試薬、例えば N-スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ) プロピオネートを使用することができる。

【0275】化学発光性化合物——重項酸素と化学反応を起こして準安定中間体を生成し、これが分解すると同時にあるいは分解後に、250 から 1200 nm の波長範囲内の光を放出する物質。発光は分解および発光を起こせるエネルギー受容体または触媒が存在しなくとも起ころのが普通である。この中間体はその生成後に加热しなくとも、あるいは補助的試薬を添加しなくとも自然に分解することが好ましい。しかし、中間体生成後の試薬の添加あるいは分解を促進するための高温の使用はある種の化学発光性化合物に対して要求されることがあるであろう。

【0276】化学発光性化合物は、通常は一重項酸素と反応してしばしばジオキセタン類またはジオキセタノン類を生成する電子豊富な化合物である。このような化合物の典型例は、エノールエーテル、エナミン、9-アルキリデンキサンタン、9-アルキリデン-N-アルキルアクリダン、アリールビニルエーテル、ジオキセン、アリールイミダゾールおよびルシゲニンである。他の化学発光性化合物は一重項酸素と反応して中間体を生じ、こ

47

れがその後別の試薬と反応して光を放出するというものである。

【0277】対象となる化学発光性化合物は一般に300ナノメートル以上、通常は400nm以上の波長で発光する。単独か蛍光性分子と一緒に血清成分が光を吸収する領域を越える波長で光を発する化合物は特に本発明に使用されるであろう。血清の蛍光は500nm以上で急速に落ち、550nm以上では比較的重要でなくなる。

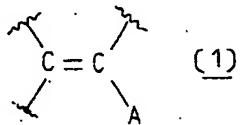
【0278】それ故に、被検物質が血清にあるときは10には、550nm以上のなるべくは600nm以上の光を発する発光性化合物が特に関心をもたれている。化学発光性化合物の自己増感を避けるためには、その化学発光性化合物が光増感剤を励起するのに用いた光を吸収しないことが好ましい。一般に増感剤を500nmより長波長の光で励起するのが好ましいので、化学発光性化合物による光の吸収は500nm以上で非常に低いことが望ましい。

【0279】化学発光性化合物から長波長発光を望む場合には、化学発光性化合物にビレンのような長波長エミッターを結合して用いることができる。別法として、化学発光性化合物を含む媒質中に蛍光性分子を含めることもできる。特に適当な蛍光性分子は活性化された化学発光性化合物によって励起され、化学発光性化合物の発光波長よりも長波長で、通常は550nmより長波長で発光するであろう。また蛍光分子は光増感剤を活性化するために使用した光の波長で吸収しないことも普通望ましい。有用な染料の例にはローダミン、エチジウム、ダンシル、Eu(fod)₃、Eu(TTA)₃、Ru(bpy)₃（式中、bpy=2,2'-ジピリジル）などが含まれる。一般に、これら染料はエネルギー

【0280】移動過程で受容体として作用し、なるべくは高い蛍光量子収率を有しかつ一重項酸素と迅速に反応しないことが好ましい。これらは粒子へ化学発光性化合物を添加すると同時に粒子に加えることができる。

【0281】電子豊富なオレフィンは一般に式：

【化1】



式中、Aは電子供与基、例えばN(D)₃、OD、p-〔C₆H₅N(D)₂〕₂、フラニル、N-アルキルイミダゾール、N-アルキルピロリル、2-インドリルなどであり、またDは、例えばアルキルまたはアリールでよく、Aはオレフィン性炭素に直接結合するか、または他の共役二重結合を介して結合するかのいずれかである。を有するオレフィンと共にした電子供与基をもつ。

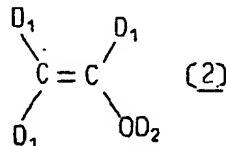
【0282】オレフィン₁中のC原子の他の原子価は1

48

から50原子の置換基で満たされるが、前記基は一緒に結合して縮合または非縮合の1個以上の環、例えばシクロアルキル、フェニル、7-ノルボルニル、ナフチル、アントラシル、アクリダニル、アダマンチルなどを形成することができる。

【0283】本発明に使用されるエノールエーテルは一般に構造：

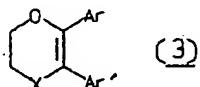
【化2】



式中、D₁は独立して引用され、そしてHおよび1から50原子の置換基、なるべくはアリール、ヒドロキシアリール、アミノアリール、t-アルキル、H、アルコキシ、ヘテロアリールなどからなる群から選ばれ、そしてその炭素原子の一つまたは両方と一緒に結合して環、例えばシクロアルケン、アダマンチリデン、7-ノルボルニリデンなどを形成することができ、D₂はなるべくはアルキルまたはアリールがよい、を有する。典型的なエノールエーテルは2,3-ジアリール-4,5-ジヒ

【0284】ドロジオキセン類：

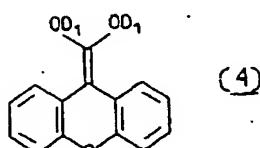
【化3】



式中、X=O、SまたはND₂、ArおよびAr'は置換アリール（少なくとも1個の置換基はアミノ、エーテルまたはヒドロキシル基として存在する）を含めてアリールである、であるが、これは例示であって制限ではない。

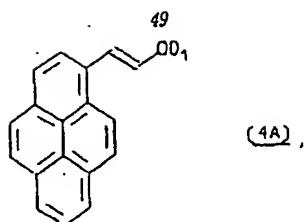
【0285】9-(ジアルコキシメチリデン)-キサンテン：

【化4】



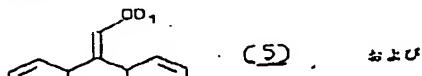
アルコキシビニルビレン：

【化5】

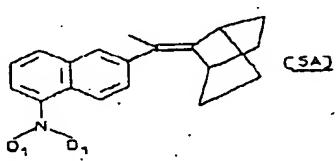


9-アルコキシメチリデン-10-アルキルアクリダ
ン:

【化6】



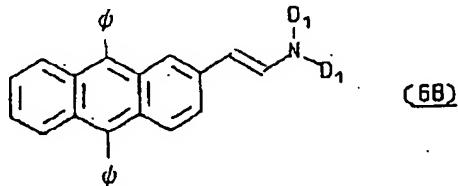
および



【0286】本発明に使用するビニルスルフィド類は一
般に酸素原子を硫黄原子により置き換えた上記エノール
エーテルを包含する。

【0287】本発明に使用するエナミンは一般に構造:

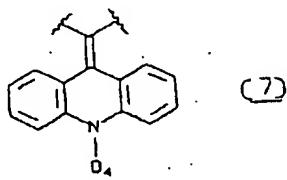
【化7】



式中、 ϕ =フェニルなど。

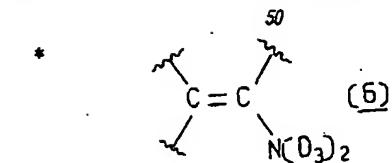
【0291】9-アルキリデン-N-アルキルアクリダ
ン類は一般に構造:

【化10】



式中、 D_1 はアルキルで、オレフィン上の残りの置換基
はH、および1から50原子の置換基、なるべくはアリ
ール、アルコキシアリール、アミノアリール、t-アル
キル、H、アルコキシ、ヘテロアリール、などがよく、
また一緒に結合して例えばアダマンチル、シクロペンチ
ル、7-ノルボルニルなどを形成できる、を有する。

【0292】典型的なアクリダン類は置換9-ベンジリ
デン-10-メチルアクリダンおよび9-ジフェニルメ
チレン-10-メチルアクリダン (Singer等、
J. Am. Chem. Soc. 102: 3823 (1950) が、そのときジオキセタンを再生成し、分解および発光

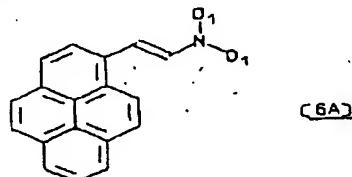


式中、 D_1 はそれぞれアルキルまたはアリールでよく、
オレフィン上の残りの置換基はHおよび1から50原子
の置換基、なるべくはアリール、ヒドロキシアリール、
アミノアリール、t-アルキル、H、アルコキシ、ヘテ
ロアリールなどから選ばれる、を有する。

【0288】典型的なエナミンは下記の化合物である
が、これらは例示であって制限ではない:

【0289】ジアルキルアミノビニルビレン:

【化8】



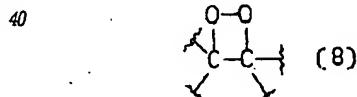
【0290】ジアルキルアミノビニル-9, 10-ジフ
エニルアントラセン

【化9】

83) および McCapra, Chem. Comm. 9
44 (1977) によって記述されている]、9-メチ
リデン-10-メチルアクリダン [E. White, C
hem. Letters 1491 (1979) により記
述されている] であるが、これらは例示としてあげたの
であって制限ではない。

【0293】炭素(C)原子上の置換基が対応するオレ
フィン:

【化11】



上に存在する基である一重項酸素と化学発光性構造物と
の反応で生ずるジオキセタンのあるものは自然に分解
し、またあるものは加熱するかまたは、通常は電子に富
むエネルギー受容体による触媒作用によるか、またはそ
の両方により分解して光を放出する。ある場合には、ジ
オキセタンは自然にヒドロペルオキシドに変換され
が、そのときジオキセタンを再生成し、分解および発光

を可能にするために塩基性pHが要求される。

【0294】化学発光性化合物のもう一つの群は2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジンジオン類である。最もよく知られた化合物はルミノールであり、このものは5-アミノ化合物である。この群中の他の化合物には置換6-アミノ, 5-アミノ-6, 7, 8-トリメトキシおよびそのジメチルアミノ【c a】ベンズ類母体が含まれる。これら化合物は多段階で一重項酸素により酸化され分解を起こしてフタレート誘導体を生成し光を放する。

【0295】もう一種の一群の化学発光性化合物は、2, 4, 5-トリフェニルイミダゾール化合物であり、これらの化合物は親化合物と共通の名称としてロフィン(Loophine)の名称を有する。この化学発光性類似化合物には、パラジメチルアミノおよびメトキシ置換化合物が含まれる。

【0296】さらに別の群の化学発光性化合物には、ピースアリーレン化合物が含まれ、この化合物はSingerによりJ. Org. Chem. 41: 2685 (1976)に記載されているビス-9, 9'-アクリジリデンおよびその10, 10'-ジメチル誘導体、ルシゲニンおよびビス-9, 9'-キサンチリデンを包含する。前記要件を満たすその他の化学発光性化合物は、1989年12月13日付で公開されたヨーロッパ特許出願0, 345, 776に見い出すことができる。

【0297】光化学的に活性化できる化学発光性化合物(PACC)は、光による直接励起または光吸収励起によって、あるいは一重項(singlet)酸素との反応によって化学反応を受け、通常250~1200nmの波長範囲内の光の同時にまたは引続いて発光を伴ない、分解できる準安定反応生成物を生成する物質である。「光活性化できる」の用語には、「光化学的に活性化できる」ことが含まれる。本発明において好適なPACCは一重項酸素と反応して、ジオキセタン化合物またはジオキセタンオノン化合物を生成する化合物である。後者の化合物は通常、電子に富むオレフィン類である。このような電子に富むオレフィン類の例には、エノールエーテル類、エナミン類、9-アルキリデン-N-アルキルアクリダン類、アリールビニルエーテル類、ジオキセン類、アリールイミダゾール類、9-アルキリデン-キサンタン類およびルシゲニンがある。「PACC」の用語の中に含まれるその他の化合物は、ルミノールおよび他のフタルヒドロジド化合物、ならびに光化学的に不安定な保護基によって保護されていることから化学発光反応を受けることから保護されている化学発光性化合物、たとえばホタルルシフェリン、アクアホリン、ルミノールなどの化合物を包含する。

【0298】有利なPACCは好ましくは、300ナノメーター以上、好ましくは500ナノメーター以上、さらに好ましくは550nm以上の波長で発光するもので 50

ある。試料成分が光吸収に有意に関与する波長域をこえた波長で光を吸収し、かつまた発光する化合物は本発明において特に使用される。血清の吸光は500nm以上で急速に減少し、600nm以上では無意味になる。従って、600nm以上の光を発光する化学発光性化合物は特に有利である。しかしながら、試料の干渉吸収がない場合には、またはさらに長い波長の光を吸収し、それによって化学発光性化合物が活性化される場合には、さらに短い波長で吸光性の化学発光性化合物が有用である。

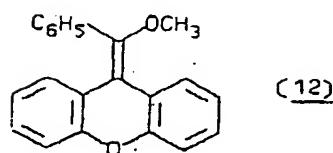
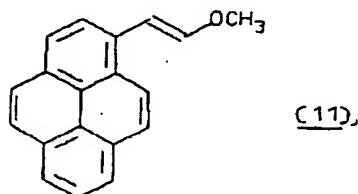
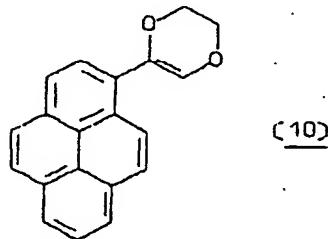
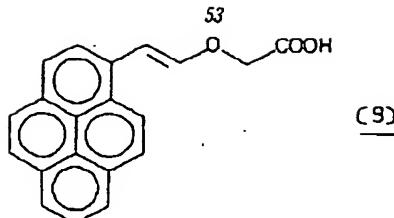
【0299】本発明のPACCは標識(ラベル)として使用され、s b pメンバーと会合させる。下記のPAC C₁は一般に、アリル系CHまたはNH基を含有していない。

【0300】本発明のPACCとして適する電子に富むオレフィン類は、本発明における「化学発光性化合物」の範囲にある。このようなPACCは通常、オレフィンに直接に結合している水素原子を有する原子を有していないが、ただしこの原子が小さい二環状環系の架橋先端位置などのように、二重結合に関与できない位置にある場合は除かれる。さらに好適なオレフィン類は、室温で急速に(60分より短い時間、好ましくは5分より短い時間、好ましくは30秒より短い時間で)崩壊するジオキセタンを生成するものである。これらのジオキセタン化合物は単独で、または蛍光エネルギー受容体と共にして、発光することができる。

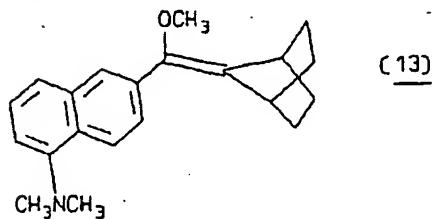
【0301】本発明のPACCとして適するエノールエーテル類はまた本発明における「化学発光性化合物」の範囲にある。特に有用なエノールエーテル化合物は、そのアリール環が蛍光を付与する位置で電子供与性基により置換されているエーテルと同一炭素上にアリールを有する化合物である。電子供与性基は、たとえばm-ヒドロキシフェニル、m-ジメチルアミノフェニル、1-(5-アミノナフチル)、ピリル、1-(3-ヒドロキシピリル)、アントラシル、クリシルなどであることができる。2位に存在する基の一方または両方がアリールであることができ、この場合には、1-炭素の酸素による置き換えによって生成されるケトンが蛍光体であることができ、このアリールはたとえばβ-ナフチルまたは2-アントリルである。

【0302】これらに制限されないが、エノールエーテル化合物の例には、下記の化合物がある：

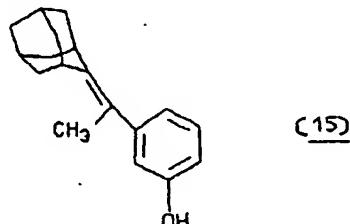
【化12】



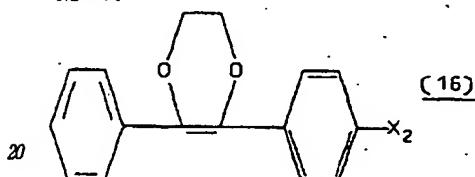
[化13]



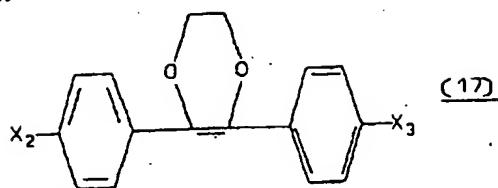
54
 (式中、X₁は、H、OC(O)CH₃、OCH₃またはOHであり、この化合物はBronstein等により米国特許第4,956,477号に記載されている)
 [化14]



(この化合物は、Bronstein等により、米国特許第4,956,477号に記載されている)
 [化15]

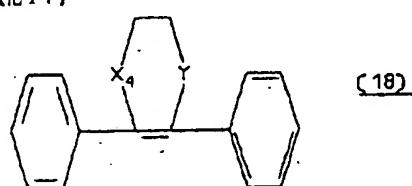


(式中、X₂は、H、OH、N(CH₃)₂またはOC₂H₅であり、この化合物はP. Schaapにより、J. Am. Chem. Soc., 104:3504(1982)に、およびP. Schaapにより、Photochem. and Photobiology 30:35(1979)に記載されている)
 [化16]



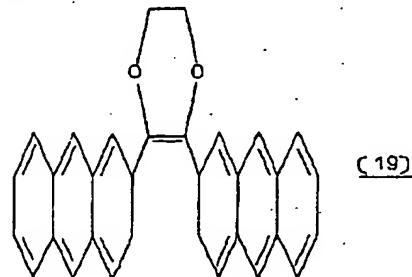
(式中、 X_2 は上記定義のとおりであり、 X_3 は H, O, CH₃, または N (CH₃) : であり、この化合物は P. Schaap, Report to U. S. Army Research Office, October 10 15, 1986 and S. D. Gagnon, Ph. D. Thesis, Wayne State University (1982) により開示されている)

【化17】



(式中、 X_4 = O, S, CH₃, N または PhN であり、そして Y = O, S または CH₃, N であり、そして Ph = フェニルであり、この化合物は P. Schaap により Report to Office of Naval Research, 1987年3月17日に開示されている)

【化18】



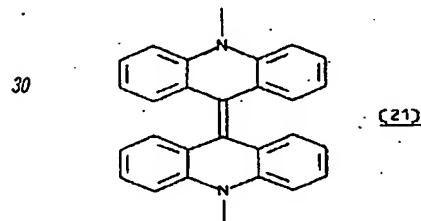
(この化合物は、P. Schaap により、Report to U. S. Army Research, 1986年10月15日に記載されている)。

【0303】本発明のPACCとして適するエナミン類はまた、本発明における「化学発光性化合物」の範囲内にある。これらに制限されないが、特に有用なエナミン化合物の例には、上記エノールエーテル化合物3~5において、OCH₃ が N(CH₃)₂ で置き換えられる化合物がある。別の例には、次式で示される化合物がある:

【化19】

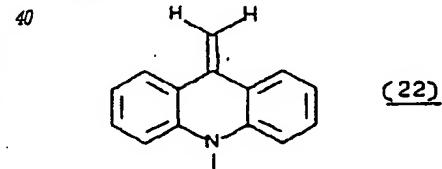
【0304】PACCとして適する9-アルキリデン-
N-アルキルアクリダン化合物はまた、本発明における
「化学発光性化合物」の範囲内にある。特に有用な化合物は、式(7)において、オレフィン上の残りの置換基
がフェニル、ナフチル、フェナントリル、m-メトキシ
フェニル、ジメチルアミノ、トリチル、メトキシ、N-
モルホレノであるか、または一緒になって環、たとえば
アダマンチル、N-メチルアクリダニド、キサンタニ
リジン、1-(3, 4-ベンゾ-5-ヒドロフリリデ
ン)などを形成していてもよい化合物である。本発明に
おいて、ラベルとして特に有用な9-アルキリデン-
N-アルキルアクリダン化合物の例には、これらに制限さ
れないが、下記の化合物がある:

【化20】



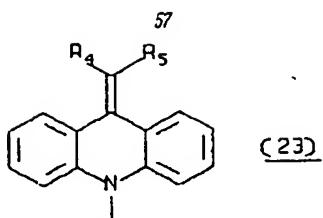
(この化合物は、Singerにより、J. Org. Chem. 41, 2685 (1976) に記載されてい
る)

【化21】



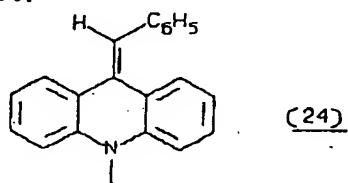
(この化合物は、E. WhiteによりChem. Letters, 12, 1491 (1979) に記載されて
いる)

【化22】



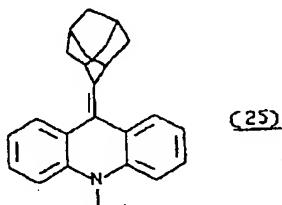
(式中、R₄ および R₅ は独立して、H またはフェニルであり、この化合物は Singer 等により、J. A. m. Chem. Soc., 102; 3824 (1983) に記載されている。)

[化23]



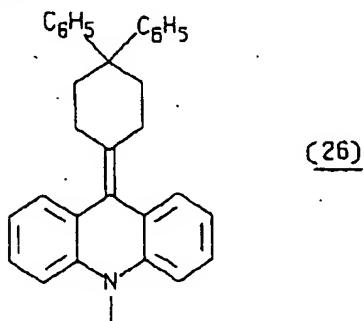
(この化合物は McCapra により、Chem. Comm., N 24, 944 (1977) および Singer 等による上記刊行物に記載されている)

[化24]



(この化合物は、 McCapra による上記刊行物に記載されている)

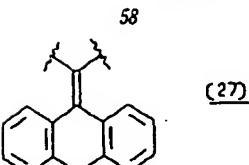
[化25]



(この化合物は、 McCapra による上記刊行物に記載されている。)

[0305] 上記刊行物の関連記載をここに引用して組み入れる。本発明のPACCとして有用な9-アルキリデン-キサンタン化合物は一般に、次の構造を有する：

[化26]



この構造式において、オレフィン上の置換基はHおよび原子数1~50の置換基、好ましくはフェニル、ナフチル、フェナントリル、m-メトキシフェニル、ジメチルアミノ、トリチル、メトキシ、N-モルホレノからなる群から選ばれ、そしてまたこれらの置換基は一緒にあって、たとえばアダマンチル、N-メチルアクリダニリド、キサンタニリジン、1-(3,4-ベンゾ-5-ヒドロフリリデン)など、たとえば9-フェニル-メチレン-キサンテンを形成していてもよい。

[0306] もう一種の一群のPACCは、2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオン化合物である。この種の最も一般的に知られている化合物はルミノールであり、この化合物は5-アミノ化合物である。この一群の中の他の化合物には、5-アミノ-6,7,8-トリメトキシ類似体およびジメチルアミノ(c a)ベンズ類似体が含まれる。ルミノールは検定法においてラベルとして使用されているが、ルミノールの励起が、本発明の場合のような光活性化によるものではなく、化学的に行なわれていたことに留意すべきである。これらの化合物は一重項酸素により、およびまた引続く過酸化物または過酸化水素との反応によって、発光とともに分解を受け、1,4-フタラジンジオン化合物に酸化される。

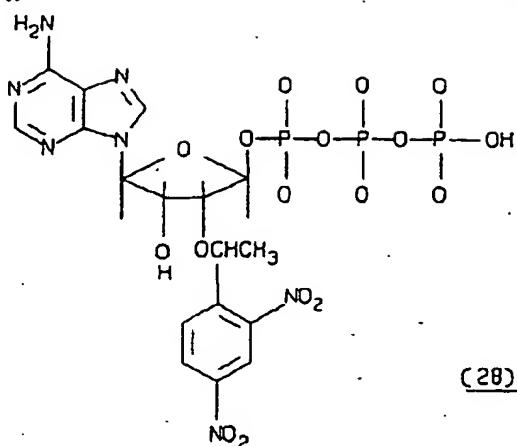
[0307] 他の一群のPACCには、2,4,5-トリフェニルイミダゾール化合物があり、この化合物はその親の化合物と共通の名称として、ロフィン(lophine)と称されている。その化学発光性類似体はパラジメチルアミノおよびメトキシ置換体を包含する。前記の要件を満たす、他のPACCは、1989年12月13日付で公開されたヨーロッパ特許出願第0,345,776号に見い出すことができる。

[0308] 保護されている化学発光性化合物は、光分離性の保護基を有するPACCである。保護基が光活性化によって分離されると、この化合物は自発的に、あるいは検定メジウム中に存在する成分により活性化されて、光を発する。光分離性保護基の例は、これらに制限されないものとして、o-ニトロベンジル、o-アシルフェニルエチル、アルコキシベンジルなどを包含し、この基は通常、PACCのヘテロ原子に結合している。保護されている化学発光性化合物の一部を形成することができるPACCの例には、前記の電子に富むオレフィン類がある。本発明のこの態様に係る保護されている化学発光性化合物の例には、下記の化合物がある：

[0309]

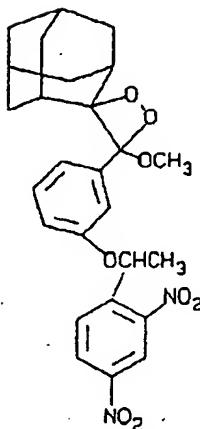
59 [化27]

59

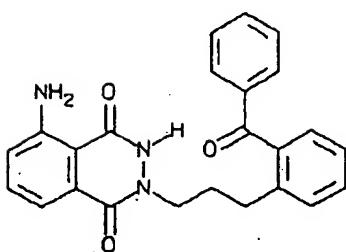


60

(28)



(29)



(30)

[0310] 保護されている化学発光性化合物の場合には、光活性化または光分解の前に、いずれか必要な助剤を存在させる。このような助剤は酵素および酵素のための基質を包含することができる。いくつかの場合には、いづれもpHの制限が必要である。その他の助剤には、アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、過酸化水素などがある。上記原則によって指示される、いずれか適当な保護されている化学発光性化合物の選択に係る追加の助剤は、当業者にとって明白なことである。たとえば、化合物1の場合には、ホタルルシフェラーゼおよびそのルシフェリン基質を使用するこ

40 とができる。化合物2の場合には、塩基性メジウム($pH > 9$)を維持することだけが必要である。2Aの場合には、過酸化水素およびホースラディッシュペルオキシダーゼを使用することができる。

[0311] 補助物質——本発明に係る検定法においては、種々の補助物質をしばしば使用する。一例として、検定メジウム中には通常、緩衝剤を存在させ、また検定メジウムおよび検定成分のための安定剤を存在させる。多くの場合には、これらの添加剤に加えて、タンパク質、たとえばアルブミン類、有機溶剤、たとえばホルムアミド、四級アンモニウム塩、ポリカチオン、たとえば

61

デキストラヌルフェート、界面活性剤、特に非イオン性界面活性剤、結合増強剤、たとえばポリアルキレンジリコール類などを含有させることができる。増感剤が照射によるよりも、化学的に活性化されるものである場合には、補助剤として、過酸化水素をしばしば含有させる。化学発光性化合物の発光波長を、より長い波長に移すことが望まれる場合には、またはその酸素活性化形態の分解を触媒させることができるとされる場合には、蛍光分子を使用することができる。

【0312】全体的に、または部分的に引続いて、本発明で使用される試料および各種助剤を、夾雜ではなく、(同時的に)配合する場合には、1種または2種以上の使用剤を残りの使用剤の1種または2種以上と組合せて、準配合物を生成させることができる。この準配合物はそれぞれ、次いで本発明の工程の1つまたは2つ以上に付することができる。すなわち、これらの準配合物はそれぞれ、所望の結果の1つまたは2つ以上が得られる条件の下にインキュベートすることができる。

【0313】エネルギー受容体-本明細書において、この物質はまた、蛍光エネルギー受容体の用語でも表わされている。310nmより高い、通常350nmより高い、そして好ましくは約400より高い、実質的吸光値を有する発色団。エネルギー受容体の選択はまた、特定のPACCによって支配される。エネルギー受容体はPACCによって発射される光を吸収することができるものでなければならない。好ましくは、エネルギー受容体の最大吸収値は化学発光性化合物の最大発光と同様の波長であるべきである。吸光係数が高いことが望ましく、通常10より大きく、好ましくは10¹より大きく、特に好ましくは10¹より大きいことが望ましい。

【0314】エネルギー受容体として有用な種々の一連の分子はU11man等により、コラム8および9の

62

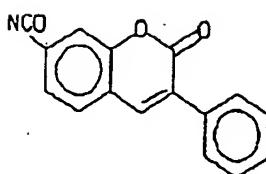
I、II、IVおよびVに記載されており、これらの関連記載をここに引用して組入れる。一般に、エネルギー受容体は蛍光化合物または蛍光体であるが、非常に弱い蛍光を有するか、または蛍光を有していないエネルギー受容体も有用である。

【0315】多くの上記の望ましい性質を有する一群の蛍光体はキサンテン染料であり、この染料には、3, 6-ジヒドロキシ-9-フェニル-キサントヒドロールから誘導されるフルオレセイン類、3, 6-ジアミノ-9-フェニルキサンチドロールから誘導されるローダミン類およびローザミン類が含まれる。ローダミン類およびフルオレセイン類は、9-o-カルボキシフェニル基を有し、9-o-カルボキシフェニル-キサントヒドロールの誘導体である。これらの化合物は、結合部位として、または結合性官能性基として、フェニル基上に置換基を有するものとして市販されている。たとえば、アミノおよびイソチオシアネート置換フルオレセイン化合物が市販されている。

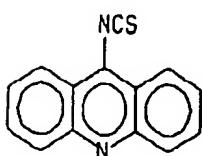
【0316】他の一群の蛍光化合物は、アルファまたはベータ位置に、通常アルファ位置に、アミノ基を有するナフチルアミン化合物である。ナフチルアミン化合物の中には、1-ジメチルアミノナフチル-5-スルホネット、1-アニリン-8-ナフタレンスルホネットおよび2-p-トルイジニル-6-ナフタレンスルホネットが含まれる。

【0317】活性化されると、タンパク質と反応する染料前駆化合物としては、3-フェニル-7-イソシアナトクマリン；9-イソチオシアナトアクリジンなどのアクリジン化合物；N-(p-(2-ベンゾキサゾイル)フェニル)マレイミド；下記の式で示される化合物などのベンゾキサジアゾール化合物：

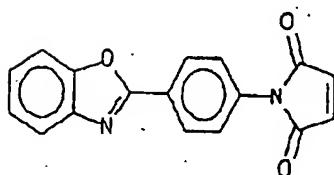
(化28)



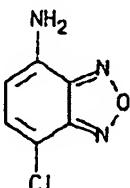
(31)



(32)



(33) および



(34)

4-クロロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1, 3-ジアゾール；4-ジメチルアミノ-4'-イソチオシアナストルベンおよび4-ジメチルアミノ-4'-マレイミドスチルベンなどのスチルベン化合物；が含まれる。

【0318】さらに官能性にして、s b pメンバーと組合させることができる、その他の染料には、アクリジンオレンジ、7-(*p*-メトキシベンジルアミノ)-4-ニトロベンゾ-2-オキサ-1, 3-ジアゾール；N, N'-ジオクタデシルオキサカルボシアニン*p*-トルエンスルホネート；8-ヒドロキシ-1, 3, 6-ビレントリスルホン酸および1-ビレン酷酸などのビレン化合物；メロシアニン540、ローズベンガル；およびその他の容易に使用できる蛍光発光分子が含まれる。

【0319】ポリヌクレオチド検定の場合には、多くの種々のエネルギー受容体を使用することができるが、二重鎖核酸に結合すると、蛍光を増すものが好ましい。エビジウムプロマイドおよびアクリジンオレンジなどのように、侵入する染料は代表的例である。Bartonによって開発されたルテニウム誘導体 (J. Am. Chem. Soc. (1990) 112: 4960) は、特に重要であり、これはこの化合物が挿入されると劇的に切り換えるからである。別様には、エネルギー受容体は化学発光性化合物でラベルしたプローブに接して結合

することができる第二のポリヌクレオチドプローブに結合させることができ、あるいはエネルギー受容体は結合されずに、溶液中で自由に分散されるものであってもよい。蛍光を有していないエネルギー受容体も含むことができ、これは広く種々のアゾ染料、シアニン染料、4, 5-ジメトキシフルオレセイン、ホルマザン類、インドフェノール類などのいずれでもあることができる。

【0320】本発明の態様の一つは、被検物質の測定方法である。この方法は、増感剤によって発生される短命な一重項酸素がその自発的崩壊の前に、化学発光性化合物を反応することができるほど極めて接近することができる量の化学発光性化合物及び増感剤に対して、被検物質（存在する場合）が影響を及ぼすような条件の下に、被検物質を含有するものと予想されるメジウムを処理することからなる。この方法はまた、化学発光性化合物によって生じるルミネセンスの強度の測定を包含する。生じるルミネセンスの強度はメジウム中の被検物質の量に関連する。化学発光性化合物は一重項酸素によって活性化することができ、そして増感剤は、通常、光励起に応答する一重項酸素の生成および引続く分子状酸素へのエネルギー転移を触媒する。多くの場合に、表面を増感剤および化学発光性化合物と極めて接近させる。この場合の表面は好ましくは懸濁できる粒子の表面である。化学発光性化合物の活性化によって生成される生成物は、光

65

の発射をともない、好ましくは自発的に分解する。

【0321】この方法は増感剤の分子と化学発光性化合物の分子とを、検定メジウムのカサ高の溶液中におけるそれらの間の平均間隔よりも相互に接近させるか、またはこれらの分子を干渉する、被験物質の存在を予想させる。この分離は被分析試料中に存在する被験物質の量に依存する。

【0322】増感剤分子は、化学発光性化合物と会合されていないと、水性メジウム中で崩壊を受ける前に化学発光性化合物に到達することができない一重項酸素を生成する。しかしながら、増感剤と化学発光性化合物とが被験物質の量に応じて、相互に極めて接近すると、増感剤の照射によって生成される一重項酸素は、崩壊を受ける前に、化学発光性化合物を活性化することができる。多数の化学発光性化合物分子および（または）増感剤分子を表面と会合させることができ、かつまた拡散を表面に限定することができることから、増感剤および化学発光性化合物と結合している表面の存在は、化学発光性化合物に対する一重項酸素の崩壊前の効力または作用を増加させる。従って、被験物質の存在の関数として、増感剤と化学発光性化合物とを接近させる表面を使用することは、好ましいことである。本発明の検定法は、広範囲の種々の被験物質を、簡単で、効率良く、再現可能な方法で検出および測定するための方法を提供する。この方法には、反応中に生成される光の量を測定するための簡単な装置を使用することができる。

【0323】化学発光性化合物と極めて接近する増感剤の量は、増感剤と化学発光性化合物とがそれぞれ、s b p メンバーと会合されていることから、被験物質の存在によって影響を受ける。これは、多くの方法で達成することができ、従って、「会合」（associated with）の用語で表わすことにする。増感剤および化学発光性化合物は、s b p メンバーに共有結合するための官能性基を含有でき、あるいはs b p メンバーまたはs b p メンバーに結合できる基は増感剤および（または）化学発光性化合物に結合するための官能性基を含有することができる。

【0324】この結合は2種の分子間の直接結合によって達成することができ、あるいはs b p メンバーと増感剤または化学発光性化合物との間に結合性基を使用することができる。もう一つの態様においては、増感剤および化学発光性化合物の一方または両方を表面に結合させるか、または粒子中に配合することもでき、ここにまた、s b p メンバーを結合させる。これらの方法の両方において、s b p メンバーはそれぞれ、被験物質またはその濃度が被験物質の存在によって左右される検定成分に直接的に、または間接的に結合することができる。

【0325】増感剤および化学発光性化合物は、粒子の少なくとも1つの相中に可溶性であることにもとづいて、粒子中に配合することができ、この場合には、増感

66

剤および化学発光性化合物は、一団の検定メジウム中よりも、粒子内に高濃度で存在する。増感剤および化学発光性化合物を粒子に共有結合させる場合には、増感剤および化学発光性化合物、あるいは粒子またはその成分を官能性にして、増感剤および化学発光性化合物と粒子とを結合する手段を得る。粒子が油滴またはリボソームである場合には、増感剤および化学発光性化合物は1個または2個以上の長鎖状炭化水素に結合させることができ、この炭化水素鎖はそれぞれ、少なくとも10～30個の炭素原子を有するものである。粒子が滴状フルオロカーボンである場合には、これらの粒子中に配合する増感剤または化学発光性化合物をフッ素化して、溶解性を増加させ、かつまた別のラベルと結合した別の粒子中の交換を減じることができる。この場合に、結合に使用する炭化水素は好ましくは、フルオロカーボン鎖で置き換えることができる。

【0326】シリコーン液状粒子の場合には、増感剤および化学発光性化合物はポリシリコンに結合させることができる。粒子1個当たりの増感剤または化学発光性化合物の分子の数を最大にするためには、通常、増感剤または化学発光性化合物の電荷および極性度を最少にし、これが粒子の非水性部分に存在するようになることが望ましい。粒子がリボソームであり、かつまた増感剤または化学発光性化合物をリボソームの水性相に保有したい場合には、極性または電荷が高い増感剤または化学発光性化合物を使用することができる。

【0327】増感剤および化学発光性化合物をどのようにして結合させるかは問題ではない。どちらの化合物も検定期間に、そのs b p メンバーから脱離することができないものであり、かつまた別の一组の増感剤および化学発光性化合物に結合しているs b p メンバーと結合することができないものであることが必須要件である。すなわち、これらの化合物のそれらの各s b p メンバーからの脱離は検定に要する時間よりも遅くあるべきである。

【0328】化学発光性化合物は、被験物質あるいはその濃度が被験物質の存在によって左右される検定成分に対し直接的にまたは間接的に結合できるs b p メンバーに結合させることができ。「直接的にまたは間接的に結合できる」との用語は、指定の実体がこの実体に特異的に結合できる（直接的に）か、または特異結合性の一组のメンバーやまたは別の実体を結合できる2種または3種以上のs b p メンバーの複合体に結合できる（間接的に）ことを意味する。

【0329】表面は一般にそこに結合されているs b p メンバーを有する。好ましくは、化学発光性化合物を、通常、懸濁できる粒子内の表面と会合させる。このs b p メンバーは一般に、被験物質または被験物質に対するレセプターに、直接的にまたは間接的に結合することができる。増感剤と会合されたs b p メンバーおよび化学

67

発光性化合物と会合された s b p メンバーが両方ともに、被験物質に結合できる場合には、サンドイッチ検定法が得られる。増感剤と会合した s b p メンバーまたは化学発光性化合物と会合した s b p メンバーのうちの一方が被験物質および被験物質類似体の両方と結合できる場合には、競合式検定法が得られる。化学発光性化合物の粒子表面への結合または粒子内への配合は一般に、増感剤の粒子表面への結合または粒子内への配合に係る前記原則と同一の原則によって支配される。

【0330】増感剤は通常、上記反応体を含有するメジウムを照射することによって、化学発光性化合物を活性化させる。このメジウムは増感剤を励起状態に変換するのに充分のエネルギーを有する波長を有する光によって照射しなければならない。これによって、増感剤は分子状酸素を一重項状態の酸素に活性化することができるようになる。分子状酸素を励起させることができると増感剤の励起状態は一般に、三重項状態 (triplet) であり、この状態は基底状態の増感剤よりも、約 20% 一般に少なくとも 23 Kcal/mol 高いエネルギーを有する。好ましくは、メジウムを、約 450 ~ 950 nm の波長を有する光により照射するが、さらに短い波長、例えば 230 ~ 950 nm の波長の光を使用することもできる。生成されるルミネセンスは、写真により、肉眼による、または光度測定によるなどいずれか慣用の方法によって測定し、その量を決定することができる。この測定量はメジウム中の被験物質の量に関連する。

【0331】増感剤は通常、この増感剤によって効果的に吸収される波長の光により照射することによって励起させることができると好ましいが、その他の励起手段も使用することができ、たとえば励起状態のエネルギー供給体、たとえば第二の増感剤からのエネルギー転移によるものである。第二の増感剤を使用する場合には、増感剤によっては充分に吸収されないが、第二の増感剤によっては充分に吸収される波長の光を使用することができる。この第二の増感剤は、たとえば第一の増感剤を有する粒子の表面に結合させるか、またはこの粒子内に配合することによって、第一の増感剤と会合させるか、またはメンバーを有し、化学発光性化合物を含有する懸濁可能な粒子の組合せを用意し；(b) この組合せを光により処理し、その増感剤を励起させ；次いで(c) そこから発射されるルミネセンスの量について、この組合せを検査する；こととなる。

【0332】発射されるルミネセンスの量はメジウム中の被験物質の量に関連する。好ましくは、化学発光性化合物を懸濁可能な粒子内に配合し、かつまた s b p メンバーをこの粒子に結合させる。さらに好ましくは、増感剤を、そこに結合した s b p メンバーを有する、第二の懸濁可能な粒子内に配合する。

【0333】本発明の方法および組成物は、リガンド-レセプターなどの s b p メンバーを包含する検定法の大

68

部分、たとえば抗原-抗体反応、ポリヌクレオチド結合検定法などに会合するようにすることができる。第二の増感剤を使用する場合には、この第二の増感剤は通常、第一の増感剤の最低エネルギー三重項状態よりも高いエネルギーの、最低エネルギー三重項状態を有する。

【0334】632.6 nm の放射線を有するヘリウム-ネオンレーザーは励起用の安価な光源である。約 620 ~ 約 650 nm の領域に最大吸収を有する増感剤はこの放射線のヘリウム-ネオンレーザーに適合し、従って本発明において特に有用である。

【0335】本発明のもう一つの態様は、被験物質の測定方法であり、この方法は、(a) (1) 被験物質を含有するものと予想されるメジウム、(2) その励起状態で、酸素と一重項状態に活性化することができる増感剤（この増感剤は s b p メンバーと会合されている）、および(3) そこに結合されている s b p 適応させることができる。これらの検定法は、均一系 (homogeneous) または不均一系 (heterogeneous) 競合法もしくは非競合法であることができる。検定成分、化学発光性化合物および増感剤は、(1) 表面（使用する場合）、(2) 核酸またはレセプター、および(3) 核酸またはリガンドとともに、多くの方法で使用することができる。会合は、共有結合または非共有結合であることができる。前記および後記の説明から、特定の所望の検定に応じて、当業者は適当な会合を選択することができる。

【0336】均一系検定法においては、試料を必要に応じて予備処理し、望ましくない物質を除去する。非競合的サンドイッチ検定法における反応は、被験物質に対して相補的であり、化学発光性化合物と会合している s b p メンバー（たとえば、抗体、核酸プローブ、レセプターまたはリガンド）；被験物質に対してまた相補的であり、s b p メンバー（たとえば、抗体、核酸プローブ、レセプターまたはリガンド）と会合されている増感剤；対象試料；および必要な助剤；を包含する。好ましくは、増感剤および化学発光性化合物の一方または両方を、s b p メンバーが結合されている粒子内に配合する。

【0337】競合法においては、一つの s b p メンバーが被験物質の誘導体であることができ、そして他の一つの s b p メンバーが被験物質に対して相補的であることができる（たとえば、抗体）。どちらの方法でも、諸成分は同時に、または順次、全体的にまたは部分的に、配合することができる。活性化した増感剤によって生成される一重項状態酸素の、化学発光性化合物に対する反応能力は、s b p メンバーの被験物質に対する結合によって支配される。他方、被験物質の存在または量は、照射、加熱または化学剤の添加により、好ましくは照射により、増感剤の活性化によって発射される光の量を測定することにより、決定することができる。この結合反応

およびその程度の検出は両方ともに、分離することなく、均一溶液中で行なうことができる。このことは、化学発光性を利用する従来技術の方法に優る本発明の利点である。

【0338】不均一系検定法においては、検定成分は、s b p メンバーである被験物質を含有するものと予想される試料；化学発光性化合物および増感剤からなる群の一員を会合して有する、非分散性の表面または粒子のどちらかであることができる支持体に結合されている s b p メンバー；および s b p メンバーが独立して、直接的にまたは間接的に被験物質またはこの被験物質のレセプターを結合できるように、会合されている、上記群の他の一員を有する s b p メンバーからなる。

【0339】これらの成分は一般に、同時に、または順次、全体的に、または部分的に、配合することができる。この表面または粒子を次いで、液相から分離し、次いで分離した相または液相のどちらかを、通常、対象相の照射によって、その増感剤を活性化させる条件に付し、次いで発射された光の量を測定する。

【0340】被験物質検定における結合反応は、正常には、一般に最適検定感度を提供する、中程度の pHにおいて、水性メジウム中で行なう。好ましくは、増感剤の活性化もまた水性メジウム中で行なう。しかしながら、分離工程を使用する場合には、たとえばアセトニトリル、アセトン、トルエン、ベンゾニトリルなどのような非水性メジウムおよび非常に高い pH、例えば 1.0 より大きい pH、あるいは非常に低い pH、すなわち 4.0 より小さい pH、通常では、非常に高い pH を有する水性メジウムを使用することもできる。上記で説明したように、この検定法は検定用成分または生成物のいづれかを分離することなく（均一系）、あるいは分離して（不均一系）、行なうことができる。

【0341】水性メジウムは水単独であってもよく、あるいは 0.01 ~ 8.0 容量パーセントの補助溶剤を含有していてもよいが、通常、s b p メンバーとして、タンパク質が使用される場合には、水性メジウムは 4.0 % より少ない量の補助溶剤を含有する。結合反応用のメジウムの pH は通常、約 4 ~ 11 の範囲、さらに一般的には約 5 ~ 10 の範囲、好ましくは約 6.5 ~ 9.5 の範囲である。この pH が、一重項状態酸素の発生期間中に変化しない場合には、この pH は通常、結合メンバーの最適結合 pH と信号の生成および検定用の他の成分の安定に最適の pH との間にある。

【0342】信号の生成に、高められた pH が必要な場合には、アルカリ性試薬の添加を含む工程を、結合反応と一重項酸素の発生および（または）信号生成との間に挿入することができる。一般的に、この高められた pH は 1.0 より大きく、通常 1.0 ~ 1.4 である。不均一系検定法の場合には、上記したような、非水性溶剤をまた使用することができ、この場合には、この溶剤が一重項状

態酸素と有効には反応しないことを考慮する。

【0343】望ましい pHを得、検定期間中にこの pH を維持するために、種々の緩衝剤を使用することができる。緩衝剤の例には、ホウ酸塩、リン酸塩、炭酸塩、トリス、バルビタールなどが含まれる。使用する特定の緩衝剤には本発明において制限はないが、各検定毎に、1 種のまたは他の一種の緩衝剤が好適である。

【0344】検定において、タンパク質リガンドとレセプターとの結合反応を行なうために使用する温度は通常、中程度の温度であり、一般に測定期間中、一定の温度、好ましくは 25 ° ~ 40 ° を使用する。結合反応のためのインキュベーション温度は一般的に、約 5 ° ~ 45 °、通常約 15 ° ~ 40 °、さらに通常には、25 ° ~ 40 ° である。核酸の結合が検定中に生じる場合には、さらに高い温度、通常 20 ° ~ 90 °、さらに通常 35 ° ~ 75 ° の温度がしばしば使用される。測定中の温度、すなわち一重項状態酸素の発生および光検出の期間中の温度は一般に、約 20 ° ~ 100 °、さらに通常約 25 ° ~ 50 °、好ましくは 25 ° ~ 40 ° の範囲である。

【0345】検定することができる被験物質の濃度は一般に、約 10^{-4} M から 10^{-10} M 以下、さらに通常、約 10^{-6} ~ 10^{-11} M で変わる。検定が定量的であるか、半定量的であるか、または定性的であるか、およびまた特定の検出技術、対象被験物質の濃度および最高に望ましいインキュベーション時間とを考慮して、各種成分の濃度が通常、決定される。

【0346】競合検定法においては、検定メジウム中の各種成分の濃度は一般に、対象被験物質の濃度範囲によって決定されるが、各成分のそれぞれの最終濃度は通常、この検定の感度がこの範囲全体にわたって最適になるように、実験的に決定される。すなわち、重要な被験物質の濃度の変化が実際に測定できる信号の差違として得られなければならない。

【0347】s b p メンバーの濃度は、被験物質の濃度、所望の結合速度、および s b p メンバーが非特異的に結合する程度に依存する。通常、s b p メンバーは少なくとも最低の予想被験物質濃度で、好ましくは少なくとも予想される最高被験物質濃度で存在させる。非競合検定法の場合には、この濃度は最高被験物質濃度の 1.0 ~ 10^4 倍ができるが、通常、 10^{-4} M より少なく、好ましくは 10^{-6} M より少なく、多くの場合に 10^{-11} ~ 10^{-7} M である。s b p メンバーと会合させる増感剤または化学発光性化合物の量は一般に、s b p メンバー当たり少なくとも 1 分子であり、増感剤分子または化学発光性化合物分子を粒子内に配合する場合には、 10^4 ほど高くてもよく、通常少なくとも 10^{-1} ~ 10^1 であることができる。

【0348】添加順序は広く変えることができるが、検定の種類に応じて、或る好ましい順序がある。最も簡単

71

な添加順序は、諸物質を同時的に加える順序である。別法として、諸成分を全体的にまたは部分的に順次、配合することもできる。検定が競合的である場合には、試料と被験物質を結合できるS b pメンバーとを配合した後に、被験物質類縁体を添加することがしばしば望ましい。場合により、これらの諸成分を配合した後に、インキュベーション工程を包含させることができ、このインキュベーション工程は一般に、約30秒～6時間、さらに通常、約2分～1時間の範囲で行ない、その後で増感剤により一重項酸素を発生させ、次いで発光を測定する。

【0349】特に好適な添加順序では、被験物質に対し相補的であり、そして（または）被験物質と同族である、特異結合性の一組のメンバーからなる第一のセットを被験物質と配合し、次いで第一の特異結合性の一組のメンバーに対し相補的である特異結合性の一組のメンバーを添加する。これらのメンバーはそれぞれ、増感剤および化学発光性化合物からなる群の別々の一員と会合している。この検定混合物またはその分離した成分を次いで、照射し、その発光を測定する。

【0350】均一系検定法においては、全成分を配合した後に、所望により、これらをインキュベートすることができる。次いで、この配合物を照射し、生じる発光を測定する。この発光は被験試料中の被験物質の量に閾値する。均一系検定法で使用される本発明の諸成分の量は、被験物質の種類に依存する。一般に、本発明の均一系検定法は、EMIT検定法（商品名）のような公知検定法に比較して増大した感度を示す。この利点は、主として、本発明の方法で得られる、改善された信号対ノイズ比の結果である。

【0351】当業者が本発明の範囲を認識し、本発明を不当な実験を行なうことなく実施できるようにするために、制限的意味を有していない例を下記に示す。被験物質、増感剤、化学発光性化合物、表面、粒子および反応条件の選択は、下記の例の記載から当業者に示唆されるであろう。

【0352】本発明の態様の一つにおいて、化学発光性化合物、9-ベンザル-10-メチルアクリダンをチロイド刺激ホルモン（TSH）に対する抗体（試薬1）に共有結合させる。そのフェニル環に結合しているカルボキシル基をN-ヒドロキシスルシニミジルエステルにより官能性にした9-ベンザル-10-メチルアクリダンを抗体のアミノ基と反応させる。結合基はカルボキシアミドである。使用増感剤はローズベンガルであり、これは0.5ミクロンの平均径を有するラテックス粒子に共有結合させる。ラテックス粒子とローズベンガルとは、J. Am. Chem. Soc., 97: 3741 (1975) に記載されているように、エステル結合基を得るために、ラテックス上のクロロメチル基によって、相互に共有結合させる。

72

【0353】このラテックス粒子をTSHに対する第二の抗体にさらに結合させる（試薬2）。このためには、ラテックス上のN-ヒドロキシスルシニミジルエステル基を使用する。使用抗体は両方ともに、標準ハイブリッドセルライン技術によって調製されるモノクローナル抗体である。抗体の一つはTSHの α -サブユニットを認識し、そして他の一つはTSHの β -サブユニットを認識する。

【0354】検定の実施に際しては、TSHを含有するものと予想される血清試料を患者から得る。50マイクロリッターの試料を、上記試薬1および試薬2とともに、トリス緩衝剤によってpH8.0に緩衝されている水性メジウム500mL中で一緒に配合する。試薬1および試薬2の量は、約10⁻⁶モルの各抗体の濃度が得られるに充分にする。この反応混合物を次いで、25°Cで1時間、インキュベートし、次いで560nmの光を30秒間照射する。照射後に発射された光の強度を測定し、30秒間の間に検出された総光エネルギーを、既知濃度でTSHを含有する試料により同様の方法で得た数値と比較し、未知のTSH濃度を決定する。

【0355】別法では、インキュベーションの後に、ラテックス粒子をメジウムから分離し、pH9.5の水性緩衝メジウムに入れ、同様に照射し、次いでこの系から発射された光の量を上記のとおりに測定する。

【0356】上記方法にもとづく別法においては、試薬2が第二の抗体に共有結合したローズベンガルであり、ラテックス粒子は使用しない。さらにもう一つの別法においては、試薬2が第二の抗体に共有結合したローズベンガルであり、かつまた試薬1が、第一抗体が共有結合

30 しているラテックス粒子に共有結合した9-ベンザル-10-メチルアクリダンである。上記方法にもとづくさらにもう一つの別法においては、試薬1がすぐ上に記載されているものであり、試薬2はアビシンが共有結合しているラテックス粒子に共有結合したローズベンガルであり、かつまたビオチンに共有結合した第二の抗体である第三の試薬（試薬2A）を使用する。試薬1と第三の試薬を、試料に配合し、次いでインキュベートする。次いで、過剰量の試薬2を加え、引絞く処理は上記のとおりに行なう。

40 【0357】上記方法にもとづく、もう一つの別法においては、ローズベンガルの代りにクロロペルオキシダーゼを使用する。この検定法では、照射工程の代りに、臭化プロマイドおよび過酸化水素を添加し、一重項状態酸素を発生させる。発射された光を上記のとおりに測定する。

【0358】本発明に係るもう一つの態様においては、上記Glaeverの刊行物に従い油滴中の増感剤、クロロフィルから油滴の形態の第一セット（試薬3）を調製する。0.1～2ミクロンのサイズを有する、この油滴を官能性にし、次いでヒト慢性ゴナドトロピン（HC

G) に対するモノクローナル抗体に結合させる。クロロフィルは親油性であり、従ってこの親油性油滴中に不可逆的に溶解する。

【0359】同様の方法で、油滴形の第二のセット(試薬4)を調製する。このセットの油状滴では、この油状滴はHCGに対する第二のモノクローナル抗体に共有結合されており、この第二の抗体は上述の第一のモノクローナル抗体によって認識される以外のHCG分子の異なる部分を認識する。9-(ジフェニルメチリジン)-N-メチルアクリダンは、そのアクリダンのフェニル基の一つに結合しているN,N-ジデシルカルボキシアミド基を含むことによって、この親油性油滴に不可逆的に溶解される。これらモノクローナル抗体は、標準的ハイブリッドセルライン技術によって調製される。

【0360】HCGを含有するものと予想される尿試料(50マイクロリッター)をpH7.5の水性緩衝検定メジウム(500μL)中で、それぞれ過剰量の試薬3および試薬4と配合する。このメジウムを25℃で20分間インキュベートする。分離しないで、このメジウムを、He/Neレーザーを用いて633nmで、1分間照射し、次いで発射された光を前記のとおりに測定する。この光の量を、既知量のHCGを含有する試料から発射される量と比較し、この数値の比較によって未知試料中のHCGの量を決定する。この方法によって、HCGの簡便で、敏感な均一系免疫検定を行なうことができる。

【0361】前記方法にもとづくもう一つの別法においては、試薬3がHCGに対する抗体の代りに、フルオレセインを含有し、追加の試薬(試薬3A)がフルオレセインに共有結合したHCG抗体を有する。試薬4は第二のHCG抗体の代りに、アビシンを含有し、そして第四の成分(試薬4A)はビオチンに共有結合した第二の抗体を含有する。この検定においては、試薬4Aおよび試薬3Aを試料に配合し、インキュベートする。その後、試薬3および試薬4を加え、次いでインキュベートする。次いで、上記検定法の残りの工程を行なう。

【0362】本発明のもう一つの態様においては、pH7.4の緩衝液中のリン脂質を、当該目的用に設計されている市販の装置を用いて、0.2ミクロン孔径の膜に通す、高圧抽出によって、一組のリポソーム(試薬5)(0.2ミクロン径)を形成する。このリポソームのホスファチジルエタノールアミンとメチルカルボキシメチルジスルフィドの活性エステルとを反応させ、次いでジチオエリスリトールと反応させることによって、先ずリポソーム上にメルカプトアセトアミド基を形成することにより、リポソームにチロキシン類縁体を共有結合させる。次いで、このスルフヒドリル化したリポソームをブロモアセチルチロキシンと反応させる。このリポソームの親油性部分にメタローポルフィリン染料を溶解させる。

【0363】もう一組のリポソーム(試薬6)を使用

し、チロキシンに対するモノクローナル抗体を結合させる。この抗体はチロキシン結合と同様の方法により共有結合させる。このリポソームの表面に、カルボキシアミド結合性基によって、エナミン(2-ジメチルアミノメチレンビラン)を共有結合させる。試薬5および試薬6を、pH8.0の水性緩衝検定メジウム(500μL)中で、チロキシンを含有するものと予想される血清試料と配合する。このメジウムはアニロナフタレンスルホン酸(50マイクロリッター)を含有する。この化合物は、結合性タンパク質からチロキシンを分離し、酸素活性化ビランからのエネルギーを受け取り長波長発光を生じさせる。この検定メジウムを次いで、室温で1時間インキュベートする。分離工程を行なわずに、このメジウムを650nmで1分間照射し、生じる発光をルミノメーターにより測定する。得られた数値は、既知量のチロキシンを使用する同様の検定を行なうことによって得られた数値と比較する。この方法により、血清試料中のチロキシンの量が定量できる。

【0364】上記方法にもとづく別法においては、試薬6がチロキシンに対する抗体である代りに、アビシンを含有する。追加の試薬(試薬6A)はビオチンに共有結合したチロキシンに対する抗体を含有する。試薬5はチロキシンの代りに、フルオレセインに対する抗体を含有し、そして追加の試薬(試薬5)はフルオレセインに結合したチロキシンを含有する。この検定法においては、試薬5Aおよび6Aを、試料と配合し、次いでインキュベートする。次いで、試薬5および6を加え、この混合物をインキュベートし、検定法の残りの部分を行なう。

【0365】前記方法にもとづく、もう一つの別法においては、メタローポルフィリン染料の代りに、モリブデン酸カリウムを使用し、これをリポソームの水性相に配合する。この検定法においては、照射工程の代りに、過酸化水素を加えて、一重項状態酸素を生成させる。発射された光を前記のとおりに測定する。

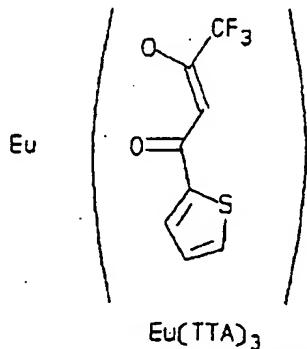
【0366】もう一つの態様においては、Grubinにより開示された方法と同様の方法により、染料結晶中で、2-ヒドロキシエチル-9,10-ジプロモアントラセンを生成させる。B型肝炎表面抗原を認識するモノクローナル抗体を、カルバメート結合基によって、染料結晶に共有結合させる。ラテックス粒子を処理し、B型肝炎表面抗原に対する第二の抗体を共有結合により不動化する。このラテックス粒子にはさらに、アミド結合基により9-(ベンザル-9H-キサンテン)を共有結合させる。この染料結晶は平均2ミクロンの粒子サイズを有し、そしてこのラテックス粒子は0.2ミクロンの平均径を有する。モノクローナル抗体は標準ハイブリッドセルライン技術によって調製される。

【0367】肝炎を患らっているものと予想される患者からの血清試料(50μL)を、pH7.0の水性検定メジウム(500μL)中で、過剰量の上記染料結晶お

およびラテックス粒子と配合する。この検定メジウムを次いで、室温で30分間インキュベートし、次いでキセノン光源を用いて、350 nmで1分間照射する。試料中にB型肝炎表面抗原が存在すると、各抗体と抗原との免疫結合によって、染料結晶とラテックス粒子とが極めて接近する。このメジウムを照射すると、9, 10-ジブロモアントラセンが励起され、分子状酸素を一重項状態酸素に変換する。この一重項酸素はキサンテンと反応し、ジオキセタンを生成させ、このジオキセタンは室温で自発的に分解し、光を発する。この光を分光計によって測定する。或るしきい値レベル以上の光量は試料中のB型肝炎表面抗原の存在を示す。このメジウムの照射は室温で行ない、そしてまた、この検定は均一系法で行なわれ、B型肝炎表面抗原用の検定法を提供する。

【0368】好適には、この検定法において、Eu⁺(TTA)₃をラテックス粒子に溶解し、励起したキサンテン誘導体のエネルギーをEu⁺(TTA)₃に移行させる。これは600 nm以上のエネルギーを発生する。キサンテンルミネセンスから直接に発射される光は血清成分によって吸収されるので、別段に生じる血清の干渉がこれによって回避される。

【化29】



【0369】もう一つの態様は、赤血球の表面上の特定の血液型抗原、すなわちA型抗原を測定する検定法である。150～500 nmの粒子サイズを有し、前記のとおりにして調製されるラテックス粒子を使用する。このラテックス粒子は、このラテックス粒子に共有結合したA型抗原に対する抗体を有する。この粒子はまた、このラテックス中に溶解している、エノールエーテル、2-ドージメチルアミノフェニル-3-フェニル-5, 6-ジヒドロジオキセンを含有する。

【0370】このラテックス粒子試薬を水性メジウム(500 μL)中で、全血(100 μL)および1×10⁻¹Mの増感剤と配合する。この増感剤は疎水性増感剤、すなわちフェナジン-2-カルボン酸である。この疎水性染料は試料中に存在する赤血球中に侵入する。このメジウムを25°Cで10分間インキュベートし、次いでタンクステン光源を用いて、400～450 nmで30秒間照射する。このメジウムから発射される光を測定

し、A型抗原赤血球を含有していないことが判っている試料で得られた光の量と比較する。この場合には、しきい値レベル以上の光の量が血液型A抗原の存在を示す。

【0371】本発明のもう一つの態様においては、被験物質が細胞表面上のHLA抗原である。HLA抗原を含有するものと予想される試料(50 μL)を、pH7.4に緩衝されている水性検定メジウム(500 μL)中に投入する。このメジウムにはまた、チオエーテル結合性基によってエモシンに共有結合したHLA抗原に対する抗体である試薬の過剰量を加える。この検定メジウムに、化学発光性化合物をまた加える。化学発光性化合物は、HLA抗原を含有する細胞中に侵入するものであるように選択する。

【0372】この化学発光性化合物は、アクリダン、すなわち9-(デシルフェニルメチリジン-1)-N-(2-スルホンオキシエチル)アクリダンである。この検定メジウムを室温で1時間インキュベートし、次いでタンクステン-ハロゲン光源を用いて、500～550 nmで1分間照射する。この検定メジウムから発射される光を測定し、しきい値レベル以上の光の量がHLA抗原の存在を示す。

【0373】本発明はまた、0.04～4000ナノメーターの平均径を有し、化学発光性化合物を含有する組成物を包含する。この化学発光性化合物は、粒子マトリックスに共有結合されていてもよく、あるいはマトリックス中に溶解されているか、またはマトリックス中に溶解されている溶剤中に溶解されていてもよい。粒子は好ましくは、滴状の重合体または油状物、あるいはリポソームなどの小胞体である。粒子がリポソームである場合には、化学発光性化合物を脂質二重層と会合させるか、またはリポソームの水性内容物中に溶解させる。

【0374】この粒子はそこに結合しているs bpメンバーを含有する。好ましくは、s bp結合粒子は10～1000 nmの平均径を有する。相互に結合した2種の相補的s bpメンバーを有し、その一つが増感剤に結合しており、そして他の一つが化学発光性化合物と会合している組成物がまた含まれる。

【0375】本発明のもう一つの態様は、組合物を提供する方法にあり、この方法は、(1)被験物質を含有するものと予想されるメジウムおよび(2)PACCと会合した第一の特異結合性の一組の(s bp)メンバーを含有するラベル試薬からなる。s bpメンバー複合体が被験物質の存在に関連して生成される条件を選択する。たとえば、第一のs bpメンバーは被験物質または第二のs bpメンバーに結合して、被験物質の存在に関連する複合体を生成することができるものであることができる。この方法はまた、PACCの光化学的活性化およびPACCによって発射されるルミネセンスの量の検出を包含する。このルミネセンスの量はメジウム中の被験物質の量に関連する。

77

【0376】一般に、PACCは、光の照射によって、光化学的に活性化される。この光はPACCを直接に活性化でき、あるいは増感剤を活性化できるものである。この増感剤は照射されると、分子状酸素を一重項状態の酸素に変換させる。一重項状態の酸素は次いで、PACCを活性化する。増感剤は検定の種類に応じて、リガンドに結合させることができ、あるいは溶液中に自由に存在させることができ、あるいは表面に結合させることができ。一重項状態酸素によるPACCの活性化によって生成される生成物は光を発射して、自発的に分解できるか、あるいはさらに物理的または化学的に処理されて、発光することができる。

【0377】PACCを活性化する一重項状態酸素を生成するために、異なる多くの増感剤を使用することができる。増感剤は直接に、s bpメンバーに結合させることなく使用することができる。この方法では、比較的大きい濃度、通常少なくとも 10^{-7} M、好ましくは少なくとも 10^{-6} M、さらに好ましくは少なくとも 10^{-5} Mの増感剤を使用する。一般に、この方法で使用する増感剤の量は、PACCの活性化をもたらす濃度の一重項状態酸素を生成させるのに充分の量である。この方法は、PACCの発光が実質的に変えられる場合、複合体が生成される場合、あるいはメジウム中のPACCの量が通常、結合したラベルと未結合ラベルとの分離によって得られる場合に、使用することができる。

【0378】分離が望まれない場合には、この複合体中のPACCの発光はエネルギー受容体によって変えることができ、この場合には、被験物質が存在する結果として生成される複合体にエネルギー受容体が結合することによって、PACCに極めて接近される。このエネルギー受容体が螢光体である場合には、発光の波長が通常、変更される。エネルギー受容体が螢光体ではない場合には、PACCがこの複合体と結合された時点で、その化学ルミネンスンが通常、消失する。

【0379】本発明のもう一つの態様においては、増感剤およびPACCを一団の検定メジウム溶液と本明細書に記載の表面とに分配する。この分配は、分析しようとする試料中に存在する被験物質の量に依存し、増感剤は通常、s bpメンバーに結合させる。表面と会合しない増感剤分子は、一重項状態酸素を生成するが、この一重項酸素は水性メジウム中で崩壊を受ける前にPACCに到達することはできない。しかしながら、増感剤およびPACCが両方ともに、表面と会合して、被験物質の存在の結果として、複合体を形成する場合には、増感剤の照射によって生成される一重項酸素は、崩壊を受ける前にPACCを活性化することができる。この方法において、増感剤の使用量は、増感剤に結合したs bpメンバーを含まない増感剤を用いる前述の方法におけるよりは格別に少ない量であることができる。

【0380】理解できるように、この対象検定法は、試 50 に、または被験物質に結合できるs bpメンバーに、結

78

料中の広く種々の被験物質を検出し、測定するための、簡便で、効果的であり、かつまた再現性を有する方法を提供し、この方法には、反応中に生成される光の量の測定に、肉眼または慣用の装置を使用することができる。

【0381】被験物質の存在の結果として、増感剤が表面と会合するようになる場合には、増感剤は通常、s bpメンバーと会合させる。これは、多くの方法で達成することができる。増感剤がs bpメンバーに結合性の官能基を有していてもよく、あるいはs bpメンバーが増感剤に結合性の官能基を有していてもよい。この結合は、2個の分子間の直接結合であることができ、あるいはs bpメンバーと増感剤との間に、結合性基を使用することもできる。

【0382】もう一つの態様では、増感剤を粒子に結合させるか、または粒子中に配合することができ、この粒子にはまた、s bpメンバーを結合させる。両方の場合において、s bpメンバーは被験物質に結合することができるものである。増感剤は粒子の少なくとも1つの相に可溶性であることから、粒子中に配合することができる。増感剤を粒子中に配合しない場合には、増感剤は粒子に結合させることができる。この目的には、増感剤または粒子、あるいはその成分を官能性にして、増感剤および粒子の結合手段を得る。油状滴の形態または脂質二重層の形態の粒子の場合には、粒子組成に適合しうる長鎖状炭化水素に結合させることによって、増感剤を粒子に結合することができる。多くの場合に、8~20個またはそれ以上の炭素原子を有する、少なくとも1種の、好ましくは2種の炭化水素鎖が使用される。

【0383】粒子がフルオロカーボンの滴状物である場合には、増感剤をフッ素化し、その溶解性を増大させ、かつまた交換を減じることができ、好ましくは、結合に使用する炭化水素鎖の代りに、フルオロカーボン鎖を使用する。シリコーン粒子の場合には、増感剤はポリシロキサンに結合させることができる。通常、増感剤の電荷および極性を最少にして、増感剤が粒子の非水性部分内に存在するようにするが望ましい。前述したように、このs bpメンバーに結合した増感剤を含む方法は、本明細書中に充分に説明されている。

【0384】前述したように、PACCは「s bpメンバーと会合させる」、すなわち本発明においてPACCはラベルとして機能する。本明細書で使用するものとして、「s bpメンバーと会合」の用語は、次の様相を包含する：通常、PACCとs bpメンバーとの会合は共有結合による。しかしながら、このラベル試薬がまた、離脱できる粒子からなり、この粒子にPACCが結合しているか、またはこの粒子内にPACCが非共有的に配位されていることもできる。この離脱できる粒子はまた、そこに結合したs bpメンバーを有する。

【0385】このs bpメンバーは一般に、被験物質

79

合することができる。もう一種のs b pメンバーを使用し、これを被験物質に結合させることができる場合には、サンドイッチ検定法が得られる。PACCに結合したs b pメンバーはまた、被験物質に対し類縁体であることができ、この場合には、競合検定法を得ることができる。

【0386】増感剤を使用する場合に、増感剤は、上記諸反応体を含有するメジウムが照射されると、PACCを活性化する作用を果たす。メジウムは増感剤を励起状態に変換し、分子状酸素を一重項状態酸素に活性化できるのに充分のエネルギーの波長を有する光で照射する。s b pメンバーに結合している場合には、この増感剤の濃度は非常に小さく、しばしば $10^{-6} \sim 10^{-11}$ Mまたはそれ以下であることができる。増感剤が結合されていない場合には、増感剤濃度は、明白な量の光を吸収するに充分の濃度、通常少なくとも0.1%、好ましくは1~80%である。

【0387】増感剤の励起状態は通常、最低三重項状態であり、基底状態よりも少なくとも $25\text{ Kcal}/\text{mol}$ 、好ましくは $23\text{ Kcal}/\text{mol}$ 多くのエネルギーを有する。一般に、メジウムは、約 $300 \sim 1200\text{ nm}$ 、通常 $450 \sim 950\text{ nm}$ 、好ましくは $550 \sim 800\text{ nm}$ の波長を有する光により照射する。照射時間は活性化PACCの寿命、光強度および所望の発光強度に依存する。短命の活性化PACCの場合には、この照射時間は、マイクロ秒ほどの短い時間であることができ、この場合には、強いフラッシュランプまたはレーザーを使用する。長命な活性化PACCを使用する場合には、この照射時間はさらに長くてもよく、かつまた強度の低い光源を使用することができる。

【0388】一般に、照射期間にわたる集積光強度は増感剤分子の少なくとも0.1%、好ましくは少なくとも30%を励起させるのに充分なものであるべきであり、最も好ましくは、増感剤の分子の全部を少なくとも一度は励起させる強度である。

【0389】上記いずれの場合においても、生成される光またはルミネセンスは肉視により、写真により、日射計により、分光光度計により、あるいはいずれかその他の慣用的測定手段により、その量を測定することができ、この量はメジウム中の被験物質の量に関連する。

【0390】ヘリウム-ネオンレーザーは、632.6 nmで励起させるための、安価な光源である。この波長で光を吸収する増感剤は、ヘリウム-ネオンレーザーの発射線と適合でき、従って本発明において特に有用である。その他の光源には、たとえばアルゴン、YAG、He/Cdおよびルビイなどの他のレーザー類、ホトダイオード類、水銀、ナトリウムおよびキセノン蒸気ランプ、タングステンおよびタングステン/ハロゲンなどの強烈なランプ、およびフラッシュランプが含まれる。

【0391】本発明のもう一つの態様は、被験物質の測

80

定方法にあり、この方法は、(a) (1) 被験物質を含有するものと予想されるメジウム、(2) 一重項状態酸素との反応によって化学発光することができる化合物に結合した一对の特異結合体(s b pメンバー)のうちの第一のメンバーを含むラベル試薬および(3) 上記ラベル試薬を含むs b pメンバー複合体が上記メジウム中の被験物質の存在に関連して生成され、上記化学発光性化合物からのエネルギーが下記蛍光エネルギー受容体を活性化できる条件の下に、第二のs b pメンバーに結合した、または結合できるようになる蛍光エネルギー受容体を含有する不溶化した試薬を、同時に、あるいは順次全体的または部分的に、検定メジウム中で配合し、(b) 上記化合物を光により活性化し、次いで(c) その存在または強度が上記メジウム中の被験物質の量に関連する信号に関して、上記検定メジウムを検査する、ことからなる。

【0392】本発明に係るこの方法および組成物は、リガンド-レセプターなどのs b pメンバーを含む検定法の大部分、たとえば抗原-抗体反応、ポリヌクレオチド結合検定などに適合させることができる。この検定法は、均一系、不均一系、競合式またはサンドイッチ式であることができる。均一系検定法においては、望ましくない物質を分離するために、必要に応じて、試料を予備処理することができる。サンドイッチ式検定法の場合の免疫学的反応は通常、s b pメンバー、たとえば抗体および対象試料を包含する。この抗体は被験物質に対し相補的であり、PACC、第二のs b pメンバー、たとえば抗体に結合することができ、この第二の抗体はまた、被験物質に対し相補的である。競合法においては、PACCは被験物質に対する類縁体、通常、被験物質の誘導体と、または被験物質に対し相補的s b pメンバー、たとえば抗体と、会合させることができる。

【0393】PACCはそれだけで、またはエネルギー受容体と会合させて使用することができる。エネルギー受容体を活性化するために活性化PACCによって発生される発光能は、2種のs b pメンバーの結合によって支配されることがある。あるいは活性化PACCの近くに比較的高濃度のエネルギー受容体が存在する結果であることもある。後者の場合に、その濃度は通常、少なくともマイクロモル、通常ミリモルである。これとは逆に、PACCがs b pメンバーに結合している場合には、その濃度は全く少なく、しばしば $10^{-6} \sim 10^{-11}$ M、通常 $10^{-6} \sim 10^{-11}$ Mであり、その程度の検出は、均一溶液中で分離することなく行なうことができるが、ただしPACCが結合性複合体中に存在する場合には、ルミネセンス強度は変えられる。

【0394】不均一系検定法では、s b pメンバーである被験物質を含有するものと予想される試料を、支持体に結合した相補的s b pメンバーからなる試薬と配合する。この支持体はPACCを有する表面または粒子であ

81

ことができる。もう一つの s b p メンバーと会合しているエネルギー受容体をまた使用することができ、この場合には、この s b p メンバーは被験物質に対し相補的であるか（サンドイッチ式）または類似体であるか（競合式）のどちらかができる。これらの材料は一般に、同時的にあるいは順次全体的または部分的に配合する。この支持体を次いで、液相から分離し、固体相または液体相のどちらかを、通常対象の特定の相の照射、および発射光の量の測定によって、ルミネセンスエネルギーの存在に関して検査する。

【0395】被験物質の検定は通常、中程度の pH、一般に最適検定感度を提供する pHにおいて、水性緩衝メジウムで行なう。前記で説明したように、この検定法は、検定成分または生成物のいずれをも分離することなく（均一系）またはこれらのいずれかを分離して（不均一系）、行なうことができる。

【0396】この水性メジウムは水単独であることができ、あるいは 0.01 ~ 8.0 容量パーセント、またはそれ以上の補助溶剤を含有していてもよい。メジウムの pH は通常、約 4 ~ 13 の範囲、さらに通常約 5 ~ 10 の範囲、好ましくは約 6.5 ~ 9.5 の範囲である。pH は通常、結合性メンバーの最適結合 pH と検定の他の試薬、たとえば信号発生物質のメンバーに関して最適の pH との間にある。たとえば、活性化 PACC は、崩壊してルミネセンスを発生するために、或る pH 範囲を必要とすることがある。

【0397】所望の pH を達成し、測定中、この pH を維持するために、各種緩衝剤を使用することができる。緩衝剤の例には、ホウ酸塩、リン酸塩、炭酸塩、トリス、バルビタールなどが含まれる。使用する特定の緩衝剤には本発明において制限はないが、各検定毎に、1種または他の 1 種の緩衝剤が好適である。

【0398】検定の実施には通常、中程度の温度が用いられ、一般に測定期間中、一定の温度、好ましくは室温を使用する。インキュベーション温度は一般的に約 5° ~ 9.9°C、通常約 15° ~ 70°C、さらに通常では、20° ~ 45°C の範囲である。測定期間中の温度は一般に、約 10° ~ 70°C の範囲であり、さらに通常、20° ~ 45°C、好ましくは 20° ~ 25°C の範囲である。いくつかの場合には、活性化 PACC が崩壊して、ルミネセンスを発生するために、100°C まで加熱することが求められることがある。

【0399】検定することができる被験物質の濃度は一般に、約 10^{-6} ~ 10^{-11} M、さらに特に約 10^{-6} ~ 10^{-11} M で変化する。検定が定量的であるか、半定量的であるか、または定性的であるか、また特定の検出技術および対象の被験物質の濃度などを考慮して、各種試薬の濃度を決定する。

【0400】検定メジウム中の各種試薬の濃度は一般に、対象の被験物質の濃度範囲によって決定されるが、

82

各試薬の最終濃度は通常、検定の感度をその範囲全体にわたって最適するために、実験により決定される。すなわち、被験物質の濃度の有意の変化は正確に測定できる信号の差異を提示する。

【0401】添加の順序は広く変えることができるが、検定の種類に応じて或る好ましい順序がある。特に均一系に対する最も単純な添加順序は全ての材料を同時に添加するものである。別法として、各種試薬を全部または部分的に順次配合することもできる。場合により、試薬の配合の後に、インキュベーション工程を含ませることができ、この工程は一般に約 30 秒 ~ 6 時間、さらに通常、約 2 分 ~ 1 時間の範囲である。

【0402】均一系検定法においては、試薬の全部を配合した後に、所望により、これらをインキュベートすることができる。次いで、この組合せ物を照射し、生じる発光を測定する。この発光は被験試料中の被験物質の量に関連する。均一系検定において使用される本発明の試薬の量は被験物質の種類に依存して変わる。

【0403】当業者が本発明の範囲を認識し、本発明を不当な実験を行なうことなく実施できるために、下記に検定の例を示すが、これは制限する意味を有するものではない。被験物質、増感剤、PACC、表面、粒子および反応条件の選択は本明細書の記載および下記の例から当業者に示唆されることは明らかである。

【0404】次の検定において、諸成分は、pH 6 ~ 8.5 の主として水性のメジウム中に配合する。

A. HCG 検定では、尿試料を、(1) 1 ミクロンのラテックス粒子に結合した HCG に対する抗体および (2) PACC₄ に結合した HCG の分離した、無重複エピトープに対する抗体と配合する。この懸濁液を 30 分間インキュベートした後に、粒子を遠心分離によりメジウムから分離し、洗浄し、次いで 300 nm の光を照射する。この照射後に発射される光の強度は試料中の HCG の量に関連する。分離した粒子は、直接に照射することができ、あるいは照射の前に、水性または非水性溶剤中に懸濁することもできる。

【0405】B. A に類似している血清中の HCG の検定方法では、使用するラテックスビーズを増感剤の銅フタロシアニンで染色し、次いでインキュベートした後にメジウムから分離し、次いで 600 nm の光を照射する。発射された光の強度は試料中の HCG の量に関連する。

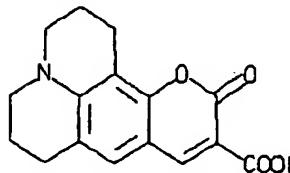
【0406】C. 血清中のジゴキシンの検定では、ジオキシゲニンに共有結合させた PACC のルミノールを、テトラデシルフタロシアニンで染色してあるボリスチレンウエル中で試料とともにインキュベートする。このウエルの表面にはジゴキシンに対する抗体を塗布する。30 分間のインキュベーションおよび検定メジウムの除去の後に、このウエルに 600 nm の光を照射する。この照射に先立ち、アルカリ溶液 (pH 10 ~ 1

83

2) を添加すると好ましい。照射後に発射された光の強度は試料中のジゴキシンの濃度に逆比例する。

〔0407〕 D. 尿中のアルブミンの検定では、試料を、(1) PACCでラベルしたアルブミンに対する抗体および(2) 次式のエネルギー受容体でラベルした無重複アルブミンエピトープに対して指向するアルブミンに対する抗体、と配合する：

〔化30〕



(35)

この検定メジウムに、増感剤、メチレンブルーを含ませる。このメジウムを10分間、インキュベートし、次いで600 nmの光を照射する。照射を止めた後に、エネルギー受容体によって発射される光(約500 nm)の強度は試料中のアルブミンの量に直接に関連する。

〔0408〕 E. 血清中のチロキシンの検定では、試料を、ラテックスビーズに結合したチロキシンと配合する。このビーズには、PACC₁₀(X: はN(C₂H₅)₂である)を配合してある。この検定メジウム中には、増感剤、ローズベンガルに結合したチロキシンに対する抗体を含めさせる。10分間のインキュベーションの後に、メジウム550 nmの光を照射し、この照射を止めた後に発射される光を測定する。この発光の強度は試料中のチロキシンの量に逆に関連する。

〔0409〕 F. DNA含有試料中の標的ポリヌクレオチド配列の検定では、9-フェニルメチリデンキサンタンであるPACC₂₃に結合されており、標的配列と相補的な25-塩基オリゴヌクレオチドを試料と混合する。このメジウムを次いで、75℃に加熱し、次いで55℃に冷却し、存在する標的配列にこのオリゴヌクレオチドを交雑する。この雑種形成溶液中には、エネルギー受容体で、挿入体であるアクリジンオレンジ、および*

84

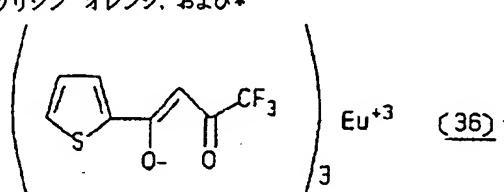
*増感剤であるフタロシアニンテトラスルホン酸を存在させるか、またはハイブリッド形成反応の完了後に、これらの成分を加えてよい。この溶液を次いで、600 nmの光で照射し、この照射を止めた後に、アクリジンオレンジによって発射される光(約500 nm)の強度を測定する。この光強度は標的配列の存在に直接に関連する。

〔0410〕 G. DNA含有試料中の標的ポリヌクレオチド配列の検定では、増感剤であるフタロシアニンによりラベルされており、標的配列に対し相補的な25-塩基オリゴヌクレオチドを、上記Fと同様に標的に交雑させる。二重鎖DNAの微少グループに結合する化合物であるHoechst dye 33258をPACC₂₀のN-メチル-9-フェニルメチリデンアクリダンに結合させ、これをメジウム中に加えるか、またはハイブリッド形成の後に加える。このメジウムに次いで、600 nmの光を照射し、この照射の停止後に発射される光を測定する。発光の強度は試料中に存在する標的配列の量に直接に関連する。

〔0411〕 H. 血清中のB型肝炎抗原(HBsAg)の検定では、試料を、(1) PACCで染色されており、かつたHBsAgに対する抗体が塗布されている150 nmラテックス粒子および(2) 増感剤テトラフェニルボルフィリンで染色されており、かつたHBsAgに対する抗体が塗布されている150 nmラテックスビーズと配合する。この混合物を1時間インキュベートした後に、この懸濁液に550 nmの光を照射する。この照射の停止後に発射される光の強度を測定する。この強度は試料中のHBsAgの量に関連する。

〔0412〕 I. 全血中のHBsAgの検定においては、方法Hにしたがうが、PACC含有ラテックスビーズを、9-フェニルメチリデンキサンタンであるPACC₂₃および次式のエネルギー受容体により染色したラテックスビーズにより置き換える：

〔化31〕



の諸試薬の割合は、方法および検定を実質的に最適にする割合にする。諸試薬はそれぞれ、別々の容器に入れることが可能、あるいは各種試薬を、試薬の交差反応性および安定性に応じて、1個または2個以上の容器で組合せることもできる。

〔0414〕 このキットの形態の一つは、(1) s bpメンバーを結合して有しており、かつた化学発光性化合物を含有する懸濁できる粒子からなる組成物および

610～620 nmで発射される光の強度を測定する。この強度は試料中のHBsAgの濃度に関連する。

〔0413〕 本発明のもう一つの態様は、被駆逐物質を含有するものと予想される試料中の被駆逐物質の存在またはその量を測定するために、本発明の検定法を簡便に行なうのに有用なキットに関する。本発明の多能性を増すために、諸試薬を同一または別別の容器にパッケージした組合せ物として提供することができる。この組合せ物中、50合物を含有する懸濁できる粒子からなる組成物および

85

(2) 増感剤、からなる。この増感剤は s b p メンバーに結合させることもでき、あるいは s b p メンバーが結合されている粒子と会合させることもできる。このキットはまた、別にパッケージされたものとして、補助試薬などを含む検定を実施するための他の試薬を包含することもできる。

【0415】本発明に係る、もう一つの形態のキットは、第一の s b p メンバーを会合している化学発光性化合物、および第二の s b p メンバーと会合しており、その励起状態で、酸素をその一重項状態に活性化することができる増感剤のパッケージされた組合せ物からなる。

【0416】もう一つの形態のキットは、(1) s b p メンバーに結合した PACC を含有する組成物を含有する。このキットはまた、1種または2種以上の追加の s b p メンバー試薬および所望により、増感剤を含有することができる。エネルギー受容体を s b p メンバーに結合させ、試薬を形成することもでき、あるいはエネルギー受容体をそれ自体、試薬として提供することもできる。表面に結合した s b p メンバーを包含させることも*

86

*できる。このキットはさらにまた、補助試薬などを含む、検定を行なうためのその他の試薬を別のパッケージとして包含することもできる。

【0417】例

本発明を、さらに以下の実施例によって説明する。実施例中で使用される部および百分率は、とくに指示のない限り、重量によるものである。温度は摂氏で表示する。

【0418】略号:

A b₁: フルオレセインに対するマウスモノクローナル抗体

10

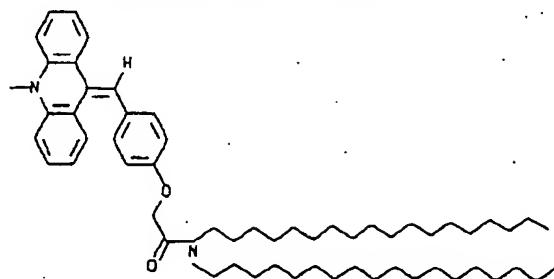
A b₂: 内因子に対するマウスモノクローナル抗体

B₁: -LC₁₅-F: 鎌長25原子の連結基、すなわち
HN-(CH₂)₄-NHCOCH₂-OCH₂-CONH-(CH₂)₄-NHCOCH₂-NHCO

によってカルボキシフルオレセイン(F)に連結されたビタミンB₁:

BA-C₁₅: 4-(N,N-ジオクタデシルカルボキシアミドメトキシ)ベンザル-9-メチルアクリジン

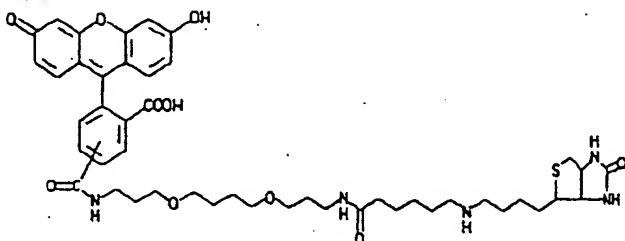
【化32】



t-Bu: 三級ブチル
TFA: トリフルオロ酢酸

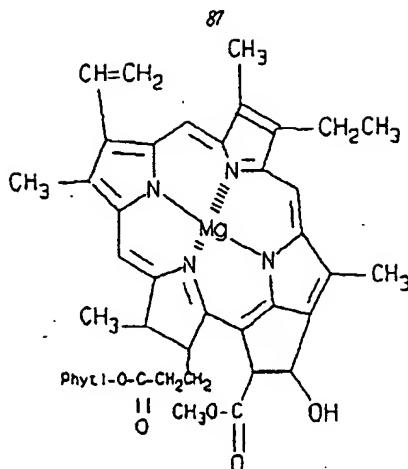
30 ピオチン-LC₁₅-F

【化33】



BSA: ウシ血清アルブミン
Chl-a-クロロフィル-a
【化34】

40

D-H₂O: 脱イオン水

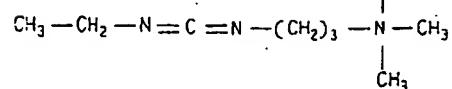
DPPC: ジバルミトイロホスファチジルコリン

DPPG: ジバルミトイロホスファチジルグリセロール

DPPE: ジバルミトイロホスファチジルエタノールアミン

EDAC: 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジimid塩酸塩

【化35】



F: フルオレセイン

F-NHS: 6-カルボキシフルオレセインのN-ヒドロキシスクシニミド

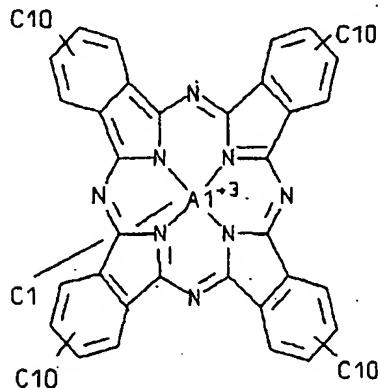
F-L C₁₀ NH₂: 連絡基HN(CH₂)₁₀NHCOCH₂OCH₂CONH(CH₂)₁₀NH₂が結合したカルボキシフルオレセイン

HCG: ヒト緑毛性ゴナドトロピン

Lip: リポソーム

n C₁₀: テトラ-(n-デシル) フタロシアニン塩化アルミニウム鉛体

【化36】



OD: 油滴

OD/BA-C₁₀: BA-C₁₀含有油滴

PB: ポリスチレンビーズ

PB/BA-C₁₀: BA-C₁₀含有PBPB/n C₁₀: テトラ-(n-デシル) アルミニウムフタロシアニン含有PB

PBS: リン酸塩緩衝食塩溶液0.02M NaPi, 0.14M NaCl/pH7.2

Pi: リン酸塩

10 Sluho-NHS: Sluho-N-ヒドロキシスクシニミド

TSH: 甲状腺刺激ホルモン(チロトロピックホルモン)

SATA: S-アセチルチオグリコール酸N-ヒドロキシスクシニミドエステル

RLU: 相対光量単位

Ab₁ (HCG): モノクローナル抗-HCG β 抗体 (12A8)Ab₂ (HCG): モノクローナル抗-HCG α 抗体 (9D7)Ab₁ (TSH): モノクローナル抗-TSH β 抗体 (35)Ab₂ (TSH): モノクローナル抗-TSH β 抗体 (9G3)〔注: Ab₁ (TSH) と Ab₂ (TSH) において、Ab₁ および Ab₂ は TSH の β 鎖の異なる 2 つのエピトープに対する抗体である〕

NHS: N-ヒドロキシスクシニミド

1F: 内因子

30 DMSO: ジメチルスルホキシド
アビシン-PB/BA-C₁₀: アビシンに共有結合したBA-C₁₀Ab₁-PB/n C₁₀: Ab₁でコートされたPB/n C₁₀

DMF: ジメチルホルムアミド

DCC: ジシクロヘキシルカルボジimid

TEA: トリエチルアミン

TLC: 薄層クロマトグラフィー

TNBSA: 2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸

40 D-1g-CMO: ジゴキシゲニン-3-オンのO-カルボキシメチルオキシムBGG: ウシャグロプリン

ビオチン-L C₁₀-NHS: Sluhoスクシニミジル-6-(ビオチンアミド)-ヘキサノエート

〔0419〕モノクローナル抗体はすべて、標準的なハイブリッド細胞法で製造した。略述すれば、適当な免疫原を宿主、通常マウスまたは他の適当な動物に注射し、適当な期間をおいたのちに宿主から脾臍細胞を採取した。別法として、宿主から非感作細胞を単離し、in vivo で免疫原により直接感作した。ハイブリッド細胞

は、上記細胞を適当な骨髓腫細胞系と融合し、融合細胞を培養することによって形成させた。培養ハイブリッド細胞を特定の抗原、たとえばTSHまたはHCGに対するその結合親和性についてスクリーニングした。多数のスクリーニング方法、たとえばELISAスクリーニングが使用された。選択された融合細胞を最クローニング化した。

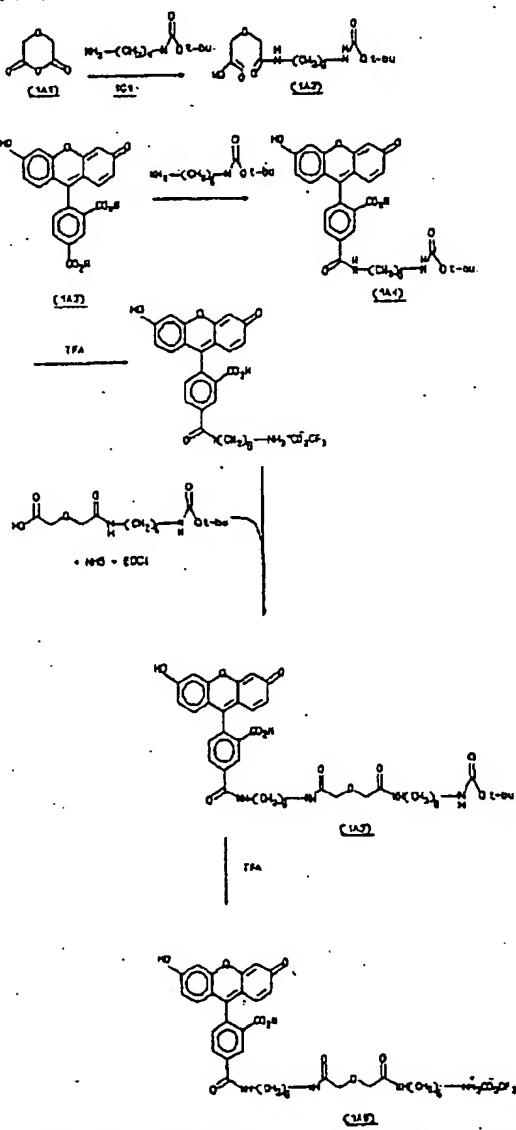
【0420】例 1

ビタミンB₁₂のアッセイB₁₂-LC₁₅-F接合体の調製25原子長の架橋腕をもつB₁₂-LC₁₅-F接合体(下記参照)は、B₁₂分子をメチルイソシアネートアセテー

*ト(B₁₂:分子中のリボースのヒドロキシル基と反応して、安心なカルバメート結合を形成する)と反応させ、ついでメチルエステル塩基加水分解してカルボキシル基を遊離することによりB₁₂分子にカルボキシル基を導入して製造した。5'-OH位に導入されたカルボキシル基をB₁₂のNHSエステルに変換し、ついでフルオレセインアミンF-LC₁₅-NH₂と反応させて最終生成物B₁₂-CL₁₅-Fを生成させた。

A. 5'-カルボキシルフルオレセイン上21原子鎖の合成反応図

【化37】



【0421】1.2 g (0.0056モル) のモノ保護ジアミン1C1を25mlの無水ジクロロメタンに溶解し、この溶液を攪拌しながら0.64g (0.0056モル) の無水グリコール酸1A1を加え、反応混合物を

室温に5時間放置した。反応混合物を濾絞し、50mlの酢酸エチルで抽出した。有機相を0.

91

1N HCl (50ml)、水 (2×50ml) で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、真空中で濃縮すると 1.35g の 1A2 が生成した。¹H NMR 100 MHz (CD₃OD) δ 4.0, 3.85 (2S, 4, O-CH₂-CO) w 3.0, 2.82 (2t, 4, NCH₃) δ 1.4 (S, CH₃) [0422] 500mg (1.33ミリモル) の 5-カルボキシフルオレセイン、1A3 (5酸化リン上、80°C、0.05mmの真空中で16時間乾燥) を 20ml の無水ジメチルホルムアミドに溶解した。この溶液を攪拌しながら、280mg (1.46ミリモル) の 1-エチル-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミドと 168mg (1.46ミリモル) の N-ヒドロキシスクシンイミドを加えた。16時間攪拌したのち、400mg (1.85ミリモル) のモノ-t-Boc 1, 6-ジアミノヘキサンを加え、この混合物をさらに4時間室温で攪拌した。得られた混合物を濃縮して濃厚な溶液とし、1:9メタノール-酢酸エチル (100ml) に溶解し、水 (3×50ml)、0.1N HCl (100ml) で抽出した。有機相を硫酸マグネシウムで乾燥し、真空中で蒸発させた。残留物を、Analtech 1000μ、20×20cmシリカゲルGFプレート上、ジクロロメタン中0.5%酢酸および10%メタノールを用いて精製した。純粋なバンドをブールし、ジクロロメタン/メタノール (1:1) で抽出し、濃縮し、残留物を最小量のメタノールに溶解し、水中に滴下した。混合物をついで遠心分離し、固体を真空中で乾燥すると 83% の 1A4 が生成した。

[0423] 3.5g (0.0064モル) のモノ-t-Boc 1, 6-ジアミノヘキシル-5-カルボニルフルオレセイン 1A4 (0.05mm真空中、五酸化リン上、90°Cで16時間乾燥) を 40ml のジクロロメタン/トリフルオロ酢酸 1/1 で処理した。この溶液を氷浴中で5分間攪拌したのち、溶媒を蒸発させ、粗製の残留物を一夜真空中で乾燥した。

[0424] 4.2mg のモノ-t-Boc 1, 6-ジアミノヘキシルグリコール酸アミド 1A2、2.2mg (0.190ミリモル) の N-ヒドロキシスクシンイミ

92

ド、および 3.6. 4mg (0.190ミリモル) の 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド 4ml の無水ジクロロメタン中に混合し、室温で 16 時間攪拌した。この活性化酸の溶液を、上述の 1, 6-ジアミノヘキシル-5-カルボキシフルオレセイン誘導体 7.5mg (0.127ミリモル)、10ml の無水ジメチルホルムアミドおよび 6.6ml のトリエチルアミンの溶液に攪拌しながら滴下した。1時間後、反応混合物を水に取り、酢酸エチルで抽出した。有機相を水 (3×25ml) で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮し、20×20cm 1000m AnaltechシリカゲルGFプレート上、ジクロロメタン中 10%メタノール、0.5%酢酸を用いて精製した。純粋なバンドを単離し、メタノール/ジクロロメタンで抽出し、濃縮し、真空中で乾燥した。残留物を 4ml のメタノールに取り、攪拌した 0.1N HCl (8ml) 中に滴下し、遠心分離し、乾燥し、8.4mg の 1A5、収率 84%を得た。¹H NMR 500 MHz (CD₃OD) δ 8.4 (d, 1, ArH, J=7.1Hz) 20 8.17 (dd, 1, ArH, J=8.0Hz) z 8.7.3 (d, 1, ArH, J=8.0Hz) δ 4.04 (d, 4, O-CH₂-CO) δ 1.41 (S, 9, 3CH₃) 元素分析 C₁₁H₁₄N₄O₁₁ として: C, 63.7; H, 6.8; N, 7.0 分析値: C, 63.56; H, 6.64; N, 7.0 [0425] 上記 5-カルボキシフルオレセインの t-Boc-21-原子長鎖アミン (0.05mm 真空中、五酸化リン上、80°C で乾燥) に、室温でトリフルオロ酢酸 5ml を加えた。5 分後、酸を蒸発させ、ついで真空中 80°C で乾燥させると、トリフルオロ酢酸塩 1A6 が得られた。

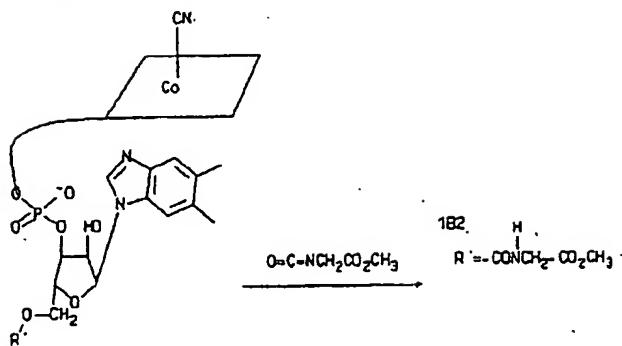
FAB-MS C₁₁H₁₄N₄O (M+H)⁺ 689

[0426] B₁₁ のリボース環の O^{1'} 位の、5-カルボキシフルオレセインに連結した 25 原子スペーサーによる修飾の反応様式

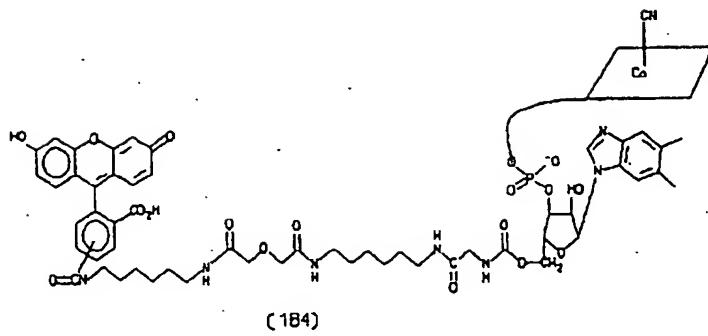
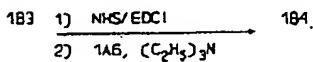
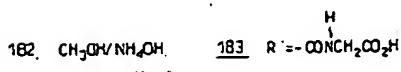
【化38】

93

94



181. R' = H



[0427] ビタミンB₁₂ (1B1) (48時間80°Cで乾燥、10μ) 25mg (0.0185ミリモル) を1.25mlの無水ジメチルスルホキシドに溶解した。この溶液に搅拌しながら、21.2mgのイソオシアネート酢酸メチルエステル (0.185ミリモル) を加え、反応混合物を室温に24時間放置した。反応混合物を搅拌した酢酸エチル溶液10ml中に滴下した。沈殿した生成物を遠心分離し、ついで最小量のメタノールに再懸濁し、再沈殿させた。この物質を、Whatman PLC₁F製造用プレート1000μ 20×20cm上、0.5ml酢酸+1gNaCl/100ml含有2:8イソプロパノール-水で溶出して精製した。50% 2:8イソプロパノール-水、0.5%酢酸、1%Na

Rf = 0.625。吸着物質から単離するとメチルエヌテル1B2が得られた。

(+) - FABM5 (C₄₇H₅₈C₆N₂O₁₂P) 分子量 1469.6; (M+H)⁺ 1470, (M-CN)⁺ 1444

[0428] 40mg (0.0272ミリモル) のB₁₂O³⁻-カルボニルグリシンメチルエヌテル1B2を2.5mlの2/1メタノール-水に取り、水酸化アンモニウムでpHを9.5に調整し、室温で16時間搅拌した。

tlc分析 Whatman KC₁F

C1

$$R_f = 0.79$$

[0429] 反応混合物を濃縮乾固し、生成物を Whatman PLC₁F プレート 1000 μ, 20 × 20 cm 2 個を用い、上述と同様に溶出して単離した。純粋なバンドをメタノールで抽出し、抽出液を濃縮し、2 : 7 メタノール-ジクロロメタンに溶解し、濃過し、濃縮した。残留物を 4 ml のメタノールに溶解し、4 ml のエチルエーテルに滴下した。沈殿を遠心分離し、P₂O₅ 上、0.5 mm, 60°C で 16 時間乾燥すると、生成物 1B3 2.8 mg が得られた。

(+) - FAB-MS ($C_{46}H_{51}CON_{15}O_{17}P$) 分子量 1455.7, ($M+H$)⁺ 1456, ($M-CN$)⁻ 1431

[0430] 1.5 mg (0.013 ミリモル) の Bi₂O₃ - カルボニルグリシン 1B3, 3.66 mg (0.016 ミリモル) N, N-ジシクロヘキシカルボジイミド、1.95 mg (0.017 ミリモル) N-ヒドロキシスクシンイミドを 5 ml の無水ジメチルホルムアミドと混合し、室温で 16 時間攪拌した。反応混合物を、13.6 mg (0.17 ミリモル) の 5-カルボキシフルオレセインの 21-原子長鎖アミン 1A6 と 2.02 mg (0.02 ミリモル) トリエチルアミンの 4 ml 乾燥ジメチルホルムアミド中溶液に攪拌しながら滴下し、室温で 12 時間攪拌した。

[0431] 粗製反応混合物を真空下 40°C で濃縮し、残留物を 2 ml のメタノールに取り、6 ml のエチルエーテルで沈殿させ、遠心分離した。固体を Whatman PLC₁F プレート 1000 μ, 20 × 20 cm 上、7 : 3 メタノール-水、0.5% 酢酸で溶出して精製した。2 R_f = 0.78, 1B4 収率 37%

(+) - FAB-MS ($C_{11}H_{13}CON_{15}O_{17}P$)⁺, ($M+H$)⁺ 2125; ($M-CN$)⁻ UV_{max} 360 (ε 26,600), 50 (ε 57,000), 550 (ε 9500)

[0432] III. 抗-内因子 (Ab₁) 抗体のビオチン化

モノクローナル抗-内因子抗体 (Ab₁) は、Kohler & Milstein: Nature 256 (1975) 495-497 に報告された方法に基づく標準的ハイブリッド細胞法によって製造した。

[0433] Pierce Chemical Co., Rockford 111. からのビオチン-LC₁-NHS を用い、3種の異なるレベルのビオチン化 (反応混合物中の Ab₁: ビオチン = 1 : 10, 1 : 50, または 1 : 200) を実施した。Ab₁ は 0.05 M NaPi, 0.05 M NaCl / pH = 7.8 中 ($1gG$) = 2.5 mg/ml とした。この溶液に、所要量のビオチン-LC₁-NHS を含有する DMSO (総容量の 1%) を加え、ついで溶液を 4°C で一夜イン

50 時間遠心分離した。わずかに青色の上清を傾瀝し、ベ

キュベートした。最後に、反応混合物を Sephadex G-25 上で精製し、0.05 M NaPi, 0.02% Na₂EDTA / pH = 7.2 に対して大規模に透析した。ビオチン化-内因子抗体は凍結して保存した。

[0434] III. 粒子の製造

A. 原料

175 nm カルボキシレート修飾ラテックス: Bang Laboratories, Inc. Carmel, IN 46032

38 nm カルボキシレート修飾ラテックス: Duke Scientific Corporation, Palo Alto, CA 94303

エチレングリコール、ベンジルアルコール、ベンゾニトリル: Aldrich Chemical Co. SephadexTM G-25: Pharmacia nC₁₀: Ultra Diagnostics Corporation, Seattle, WA 98105

[0435] B. Ab₁ - PB/nC₁₀

1. 38 nm 直径粒子

nC₁₀ の 2.1 mM 溶液をベンジルアルコール中に調製した。エチレングリコール (16 ml) を 20 ml のガラスパイアルに取り、実験室用ホットプレート上で 100° に加熱した。ベンジルアルコール (1.6 ml) を加え、混合物を電磁搅拌器で搅拌した。保存ラテックス懸濁液 (2 ml, 10% 固体含有 38 nm カルボキシレート修飾ラテックス) を加え、混合物を 3 ~ 4 分間放置して平衡化させた。nC₁₀ 溶液 (0.4 ml) を徐々に 100 μl 部ずつ添加した。100° への加熱を 5 分間続けたのち、混合物を放置して温度を室温まで低下させた。冷却後、混合物を、50% 含水エタノールで平衡化した Sephadex G-25 カラム (2.5 × 15 cm) に適用した。ラテックス含有分画をプールし、水で平衡化した第二の Sephadex G-25 カラム (2.5 × 35 cm) に適用した。ラテックスは 30 ml の容皿中に溶出した。

2. 175 nm 直径粒子

nC₁₀ の 2.1 mM 溶液をベンジルアルコール中に調製した。エチレングリコール (80 ml) を 125 ml のエルレンマイヤーフラスコに取り、実験室用ホットプレート上で 110° に加熱した。ベンジルアルコール (8 ml) を加え、混合物を電磁搅拌器で搅拌した。nC₁₀ 溶液 (2 ml) を加え、ついで直ちに保存ラテックス懸濁液 (10 ml, 10% 固体含有 175 nm カルボキシレート修飾ラテックス) を添加した。100° ~ 110° への加熱を激しく搅拌しながら 10 分間継続した。ついでフラスコを室温の水浴中に置き冷却した。冷却後、混合物を等容量のエタノールで希釈し、直ちに 15,000 rpm (Sorvall, SA600 ローター) で 2 時間遠心分離した。わずかに青色の上清を傾瀝し、ベ

ットを、粒子を分散するために浴ソニケーターを用いて50%含水エタノール(20ml)中に再懸濁した。遠心分離を15,000rpmで1時間反復した。上清を傾け、ペレットを水に再懸濁した。最後の遠心分離のち、ペレットを水に再懸濁し、最終容量を20mlとした。

【0436】3. ビーズのAb₁への結合は例3、VIに記載する。

【0437】C. アビジン-PB/BA-C₁₀

175nm直徑粒子

BA-C₁₀の10mM溶液をベンゾニトリル中に調製した。エチレングリコール(80ml)を125mlのエルレンマイヤーフラスコに取り、実験室用ホットプレート上で100°に加熱した。ベンゾニトリル(9ml)を加え、混合物を電磁攪拌器で攪拌した。BA-C₁₀溶液(1ml)を加え、ついで直ちに保存ラテックス懸濁液(1.0ml、上述の10%固体含有175nmラテックス)を添加した。加熱を100°で、激しく攪拌しながら5分間継続した。ついでフラスコを室温の水浴中に置いて冷却した。冷却後、混合物を等容量の50%含水エタノールで希釈し、直ちに15,000rpm(Sorval, SA600ローター)で計4時間遠心分離した。上清を傾け、ペレットを、粒子を分散させるために浴ソニケーターを用いて含水エタノール中に再懸濁した。遠心分離を15,000rpmで1時間反復した。上清を傾け、ペレットを水に再懸濁した。最後の遠心分離のち、ペレットを水に再懸濁して最終容量を20mlとした。ビーズのアビジンへの結合は例3、VIに記載する。

【0438】IV. アッセイプロトコール

アッセイは、アッセイ緩衝液(0.05M NaPi, 0.1% BSA, pH7.5。BSAはB₁₂およびB₁₄バインダーを含まなかった)中、B₁₂カリブレーター(元の10μg/ml B₁₂保存溶液から希釈、10μM KCN)100μlを50mlの2.2ng/ml B₁₂-LC₁₀-Fおよび50μlの予め混合した88ng/ml内因因子(IF)、8.8μg/ml Ab₁、-ビオチンと混合して実施した。これらの混合物を室温、暗所で15分間インキュベートし、ついで各チューブに10¹⁰ビーズアビジン-PB/BA-C₁₀および2.5×10¹¹ビーズAb₁-PB/nC₁₀を含有する0.75mlの0.05Tris-HCl, 0.05M NaPi, 0.15M NaCl, 0.1% Triton X-100/pH8.2緩衝液を加え、インキュベーションをさらに30分間、室温暗所で振盪しながら維持した。最後に、各チューブを、光源として650nmカットオフフィルターを付したハロゲンランプを用いて1分間照射し、ついで化学ルミネッセンス光を、Turner 20eルミノメーターを用いて20秒間集積して測定した。結果は表3にまとめる。

【0439】例 2

ジゴキシンのアッセイ

I. Ab₁-ビオチンの製造

抗ージゴキシンモノクローナル抗体(Ab₁)は標準的ハイブリッド細胞系法に従って製造し、抗体は固定化プロテインAで精製した。ついで、この抗体(0.05M NaPi, 0.05M NaCl/pH7.8中約2~2.5mg/ml)とビオチン-LC₁-NHS(Pierce Chemical Co., Rockford Ill.) (まずDMF中に可溶化し、その小部分を反応に使用)を互いに混合し、4°Cに3時間インキュベートしてAb₁-ビオチンを製造した。反応混合物中、反応原料のモル比は抗体:ビオチン-LC₁-NHS=1.25であった。カップリングしなかったビオチンはSephadex G-25カラムによって除去した。最終の接合体は、0.05M NaPi, 0.001%チメロサル/pH=7.4中、4°Cまたは凍結して保存した。

【0440】II. Dig-LC₁-Fの製造

この試薬は、(1) F-NHS、(2) F-LC₁-NH₂、および(3) Dig-LC₁-Fを製造することにより3連続工程で調製した。

A. F-NHSの製造: DMF中100mg/ml 6-カルボキシフルオレセインおよび30.6mg/ml NHSの溶液2mlに、275mg/ml DCC 0.4mlを加えた。混合物を室温暗所で一夜攪拌した。生成したジシクロヘキシル尿素を滤去した。F-NHSの形成は、シリカプレート上CH₂Cl₂:メタノール:酢酸=85:15:1の溶媒系を用いたTLCによってチェックした。DMFをロートバップで除去し、生成物(F-NHS)はさらに減圧下で乾燥し、乾燥器中に4°Cで保存した。

B. F-LC₁-NH₂の製造: DMF中ビス-(3-アミノプロピル)-メチルアミン(LC₁) (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis.) の溶液1.5mlに、DMF中125mg/ml F-NHS 1.2mlを加え、ついで室温暗所で攪拌しながら一夜インキュベートした。F-NHS:LC₁のモル比は1:40であった。次に反応混合物を0.5M NaPi/pH5.0で1/20に希釈し、混合物のpHをリン酸(1.0M)の添加によって5.0に調整し、全混合物を、0.5M NaPi/pH=5.0で平衡化したBioReactor-70¹⁰カラム(2.5×10cm)上に負荷した。負荷後、カラムを、ビス-(3-アミノプロピル)-メチルアミンが除去されるまで(TNBSA反応でモニタリング)開始緩衝液で洗浄した。カラムを0.001M NaPi/pH=6.0で洗浄して6-カルボキシフルオレセイン夾雑物を除去した。低イオン強度緩衝液による洗浄で、6-カルボキシフルオレセインのみでなく、

同定されていない他のフルオレセイン含有夾雑物も除去された。次に、カラムをD-H₂Oで洗浄して塩を除去した。最後にカラムを0.8M NH₄OHで溶出した。水酸化アンモニウムを凍結乾燥で除去了した。純度をチェックしたのち、生成物を-20°Cで乾燥器に保存した。反応は滤紙電気泳動（パラゴン電気泳動システムを用い、0.05M NaPi/pH=5.8で20分間）およびTLC（溶媒としてD-H₂O中50%メタノールを用い、C₁₈プレート上）で追跡した（また、生成物の純度をチェックした）。

[0442] C. Dig-LC₁₈-Fの製造：米国特許第4,039,385号例2の記載（この開示は参考として本明細書に導入する）に従って製造したDig-CMO 23.05mg (0.05ミリモル)、50.35mg (0.1ミリモル) のF-LC₁₈-NH₂および19.2mg (0.1ミリモル) のEDACを1.5mlのDMF/DMSO (5:1) 溶媒中に含有する溶液を、室温暗所で一夜攪拌した。Dig-LC₁₈-FおよびDig-CMO（未反応分が残っているれば）を、3mlのD-H₂Oを添加して沈殿させ、滤過し、溶媒を捨てた。滤過された物質をCH₂Cl₂：メタノール：酢酸=60:40:5からなる溶媒系に再溶解し、同じ溶媒系中シリカゲルカラム (1.5×20cm) 上に負荷した。これらの条件下に、Dig-CMOはDig-LC₁₈-F接合体の前を移動し、F-LC₁₈-NH₂はカラムの頂部に結合したままであった。この物質の純度は、上述の溶媒系を用いたTLCシリカゲルプレート、および滤纸上pH=5:8における電気泳動によってチェックした。精製された物質からロートバップによって溶媒を除去し、生成物を最小容量のメタノール/DMF (70:30) に再溶解し、ついで遠心分離して不溶性物質（シリカゲル）を除去した。最終工程は、精製時に可溶化されて生成物と共溶出する大部分のシリカゲルの除去のために実施された。生成物はメタノール/DMF (70:30) 溶媒系中に-10°C～-20°Cで保存した。生成物の濃度は、既知量の6-カルボキシフルオレセインを用いて作成した標準曲線からA₄₁₀によって測定した。

[0443] 111. アッセイプロトコール

アッセイは、血清（ヒト無TSI正常血清）中ジゴキシンカリブレーター50mlを、アッセイ緩衝液 (0.05M Tris-HCl, 0.05M NaPi, 0.15M NaCl, 2mg/ml BGG/pH8.2) 中1.74ng/mlジゴキシン-LC₁₈-F接合体50μlおよび上述の同じ緩衝液中160ng/mlのAb₁₈-ビオチン50μlと混合して実施した。これらの混合物を室温で15分間インキュベートし、ついで各チューブに、10¹⁰アクセプターピーズ（アビジン-PB/BA-C₁₈）および2.5×10¹¹感作ピーズ (Ab₁₈-PB/nC₁₈)

を含有する0.75mlの0.05M Tris-HCl, 0.05M NaPi, 0.15M NaCl/pH8.2緩衝液を加えて、インキュベーションを室温暗所でさらに30分間継続した。最後に、各チューブを、光頭として650nmカットオフフィルターを付したハロゲンランプを用いて1分間照射し、ついで化学ルミネッセンス光をTurner 20e ルミノメーターを用いて20秒間測定した。結果は図2にまとめる。

[0444] 例 3

10 100 ヒト绒毛性ゴナドトロピンおよび甲状腺

刺激ホルモンのアッセイ

I. 試薬および原料

A. BA-C₁₈は以下の操作によって製造した。試薬は、とくに指示したものを除き、Aldrich Chemicalから入手した。

1. p-ホルミルフェノキシ酢酸ジオクタデシルアミド

新たに蒸留したテトラヒドロフラン (THF) 100ml溶液に、p-ホルミルフェノキシ酢酸 (K&K Labs) (分子量180, 0.540g, 3.0ミリモル)、トリエチルアミン (分子量101.19, 0.333g, 3.3ミリモル) およびトリメチルアセチルクロリド (分子量120.57, 0.398g, 3.3ミリモル) を添加した。20分間還流加熱したのち、ジオクタデシルアミン (Fluke) (分子量522.01, 1.723g, 3.3ミリモル) を加えた。反応混合物を一夜還流した。翌日、反応混合物を水で希釈し、反応溶液をメチレンクロリドで抽出した。メチレンクロリド抽出液を硫酸ナトリウム上で乾燥した。

2. p-(N,N-ジオクタデシルカルボキシアミドメトキシベンザル-9-メチルアクリダン

無水THF中10-ジメトキシホスフィニル-9-メチルアクリダン (Monatsh. Chem. 114, 3, 1988) (分子量303.27, 0.100g, 3.3ミリモル) に、ヘキサン中1.6M n-ブチルリチウム溶液0.413mlを-78°Cで（アセトン/ドライアイス浴）アルゴン下に添加した。n-ブチルリチウム溶液を加えると溶液は黄色を呈した。n-ブチルリチウムの添加20分後に上記アミドのTHF溶液を添加した。反応溶液を一夜放置して温度を室温まで上昇させた。翌日、生成物をTLC（シリカゲル-3:7酢酸エチル/ヘキサン）によって単離した。単離された生成物はマススペクトル分析およびNMRで分析し、暗所に保存した。

[0446] B. 一重項酸素発生染料 (nC₁₈) はULTRA Diagnostic Corporationから入手した。EDAC, SATA, HCG、およびBSAはSigma Co. から入手した。Ab₁₈ (TSI) -ビオチンおよびAb₁₈ (HCG) -ビオチンならびにAb₁₈ (TSI) -Fは例1のIIの記載の操作と同様にして製造した（また、米国特許出願07/38

101

9, 659号(1989年8月4日出願)、欧州特許公告411, 945号(1991年2月6日公告)に対応参照。その関連部分を参考として本明細書に導入する)。Turner Designsのルミノメーター(20e型)を用いた。

[0447] II. 抗-HCG抗体で安定化した油滴(Ab₁(HCG)-OD/BA-C₁₁)の製造

抗-HCG抗体標識油滴(OD)は、1mlの10mg/ml抗-HCG-β(12A8, IgG)を、ジブチルフタレート中5mM BA-C₁₁ 50μl含有ガラス管中に移して製造した。蛋白質は0.05M NaPi, 0.15M NaCl/pH7.6中に取った。油分は超音波処理と同時に連続的な機械的攪拌を行い乳化した。小さな油滴の調製には高エネルギーのソニケーターが必要なことに留意すべきである。超音波処理はBransonソニケーターを用いて7分間行った(冷却剤として室温の流水を使用した)。2.5% Na₂SO₄溶液を加えて非結合蛋白質を除去すると8%~9%の最終濃度が得られ、ついで遠心分離した(マイクロフュージ、セット8, 10分間)。洗浄工程は3回実施した(遠心分離速度は、油滴が分離されるが合体はしないよう調整しなければならない)。最終の洗浄後、粒子を1mlの0.05M NaPi, 0.15M NaCl, 4mg/ml BSA/pH7.6に懸濁し、3分間再び超音波処理した。調製物の最終容量を5mlに調整し、スクロースを最終濃度2%に添加した。これらのAb₁(HCG)-OD/BA-C₁₁粒子は4°Cで保存した。上述の方法によって製造した油滴のサイズは不均一で、平均直径は1~5μであった。

[0448] III. アビシン-Lip/nC₁₀の製造
リポソームはメタノール希釈法で製造した。典型的には、脂質混合物、すなわちコレステロール(2.0mg)、DPPC(Avanti Polar Lipids, Alabaster, Ala.) (23.8)、DPPG(Avanti Polar Lipids, Alabaster, Ala.) (6.5mg)、マレイミド-DPPE(Molecular Probe, Eugene, Ore) (0.5mg)およびnC₁₀(0.5mg)を溶メタノール(200μl)に溶解し、ついで攪拌した緩衝液B(0.05M NaPi, 0.05M NaCl, 5mM EDTA/pH6.0) 2ml中に添加した。次にこの懸濁液を緩衝液B中Sephadex G-25カラム(1.5×20cm)に通した。リポソーム含有分画をブルーし、必要な場合には大きな粒子を除去するためにマイクロフュージで遠心分離した。最後に、マレイミド含有リポソームを、緩衝液B中スクシニル化アビシン-SH(以下に記載のようにして製造)の溶液に攪拌しながら添加した。アルゴンで通気洗浄後、この混合物を一夜4°Cで程やかに混合した(攪拌棒は使用しない)。2mMのメルカプトコハク

102

酸(反応混合物容量)により4°Cで30分間処理して過剰のマレイミド基を遮断し、ついでヨード酢酸を最終濃度5mMになるように加えて過剰のチオール基を遮断した(4°C, 30分)。ついで反応混合物をCentriprep-30TM装置によって2.5~3mlに濃縮し、カップリングしなかったアビシン分子は、緩衝液B中Sephadex-2Bカラム(1.5×50cm)でゲル通過して除去した。

[0449] IV. スクシニル化アビシン-SHの製造

Ab₁アビシンをSATA(アビシン1モルあたり5モル)と4°Cで一夜反応させた(1M NaPi/pH7.4中10mg/mlアビシン)。この溶液にDMF中無水コハク酸(アビシン1モルあたり50モル)を加え(総DMFは反応容量の1%未満)、溶液を2時間インキュベートした。反応混合物のpHは0.5M Na₂HPO₄を添加して7.4に維持した。室温で1時間ヒドロキシルアミン(0.1M, pH7.0)によって処理して保護チオール基を遊離させた。最後に、緩衝液B(0.05M NaPi, 0.05M NaCl, 5mM EDTA/pH6.0、気体を除去し、アルゴンを飽和)中1.5×30cm G-25カラムを用いて過剰の小分子量分子を除去した。蛋白質のピーク(アビシン-SH)を集め、この蛋白質をマレイミド含有リポソームと反応させた。

[0450] V. 抗-フルオレセイン被覆nC₁₀染色ビーズ(Ab₁-PB/nC₁₀)の製造

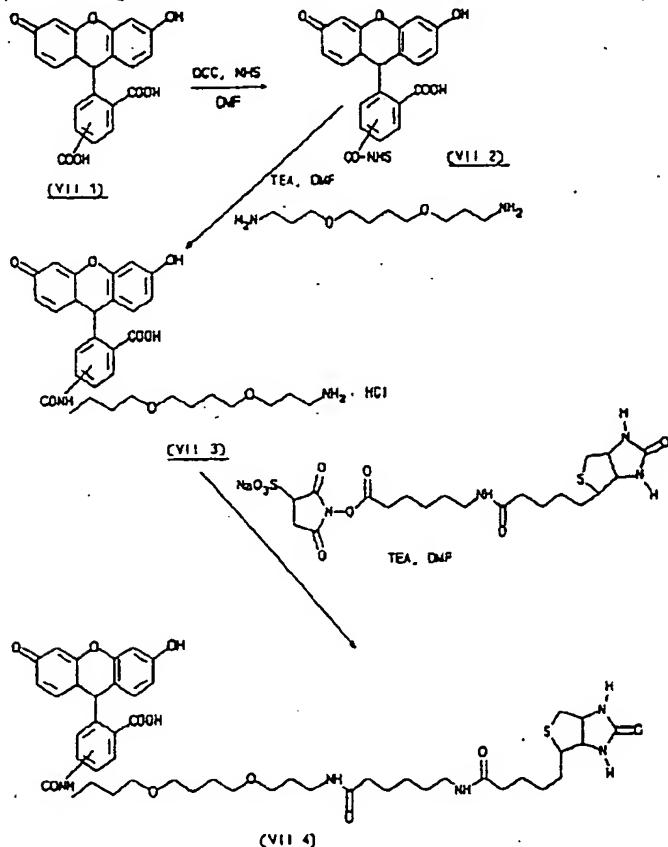
カルボキシル化ポリスチレンビーズ(38nm)(例1, IIB参照)をnC₁₀で染色した。EDAC/スルホ-NHSの接合法を用いて、これらのポリスチレンビーズにAb₁をカップリングさせた。典型的には、5mg/ml nC₁₀染色カルボキシル化ポリスチレンビーズおよび11mg/mlのスルホ-NHSを含む0.02M NaPi(pHを5.5に調整)10mlを、新たに調製したEDAC(200mg/ml)のD-H₂O中溶液1mlと混合した。室温(暗所)で25分間インキュベートしたのち、ビーズを遠心分離して過剰のEDACを除去した(EDACはこれらのビーズの微小凝集を起こさせてるので、たとえばSorvalのSA-6000ローターを15000rpmで使用する慣用の遠心分離で、それらをペレット化することが可能であった)。ペレット化されたビーズを3mlの0.005M NaPi/pH5.8に再懸濁し、攪拌した蛋白質溶液[15mlの0.02M Borax, 0.08M NaCl, 2mg/ml 3G1 IgG(Ab₁), 8mg/ml BSA/pH8.9]中に移した。この混合物を一夜4°Cで程やかに振盪した(攪拌はしない)。ビーズ上に反応性の基が残っていれば、0.083Mグリシンおよび15mg/ml BSA/pH8.9により4°Cで60分間処理して遮断した。カップリングしなかった蛋白質は、0.05M NaPi, 0.1

103

5M NaCl/pH 7.6で連続洗浄して除去した。最終ベレットは洗浄緩衝液に再懸濁し、超音波処理し、そのまま4℃に保存した。これらのビーズの最終サイズは140nmであった。

[0451] VI. アビシン被覆、ベンザルアクリジン染色ビーズ(アビシン-PB/BA-C₁₁)の製造

カルボキシル化ラテックスビーズ(0.175μ)をB A-C₁₁で染色した(例1, I I I C参照)。これらの粒子へのアビシンの接合には、EDAC/スルホ-NHS接合法を使用した。スルホ-NHS/EDACによるビーズの活性化は、A b, PB/nC₁₁の製造について上述したのと同じ方法で実施した。活性化されたビーズ(100mg)は遠心分離してEDACを除去し、ついで2.5mlの0.005M NaPi/pH 5.8に再懸濁し、攪拌したアビシン溶液(15mlの0.025M Borax, 1.33mg/ml アビシン/p*)



[0453] 2. 原料

6-カルボキシフルオレセイン、Kodak
ビオチン-NHSエストル、Pierce Chemical Co.
4,9-ジオキサ-1,12-ドデカンジアミン、Allrich Chemical Co.
酸化カルシウムから蒸留した乾燥DMF、Ag-MP-50(2.8ミリモル)を固体としてDMF溶液に加え、溶解さ

104

*H 9. 1) 中に移した。ついで混合物を4℃で一夜、混かに混合した。20μlのDMF中1M無水コハク酸(アビシンに対して60倍モル過剰)を加えてビーズ上のアビシンをスクシニル化し、さらに4℃で1時間インキュベートした。ビーズを7mg/ml BSA(反応混合物中の最終濃度)により4℃で60分間遮断した。最後にビーズを0.05M NaPi, 0.15M NaCl/pH 7.6で3回遠心分離によって洗浄し、10mlの洗浄緩衝液中に保存した。最終工程で、ビーズを超音波処理して、モノ分散粒子を得た。蛋白質の標識後も粒子サイズには有意な変化はなかった(約190nm)。アビシン-PB/BA-C₁₁は洗浄緩衝液中4℃で保存した。

[0452] VII. ピオチン-LC₁₁-Fの製造

1. 反応式

[化39]

1 (C₁₁-)陰イオン交換樹脂、BioRad Laboratories
[0454] 3. フルオレセインアミン塩酸塩VII-3
6-カルボキシフルオレセイン(VII-1)(10g, 26.6ミリモル)を乾燥DMF(25ml)に溶解した。N-ヒドロキシスクシンイミド(3.22g, 28ミリモル)を固体としてDMF溶液に加え、溶解さ

105

せた。ついで混合物を氷浴で冷却した。ジシクロヘキシリカルボジイミド (5.8 g, 28ミリモル) を乾燥DMF (10 ml) に溶解し、上述の冷DMF溶液に一度に加えた。混合物を氷浴の温度で30分間攪拌し、ついで放置して温度を室温まで上昇させた。反応の経過はt_{1c} (1%酢酸含有10%MeOH-CH₂Cl₂) で追跡した。3時間後にフルオレセインNHSエステルVII 2の生成は完結した。

[0455] 4, 9-ジオキサ-1, 2-ドデカンシア、ミン (25.5 g, 125ミリモル) を乾燥DMF (10 ml) で希釈した。フルオレセインNHSエステル反応混合物をアルゴン気相下氷中で冷却し、ジアミン溶液を5分間を要して滴加した。冷却浴を取り去り、攪拌を室温で継続した。反応の経過は上記の系を用いたt_{1c} で追跡した。反応が完結したと判断された時点で、反応混合物を水 (100 ml) によって希釈し、氷中で冷却してジシクロヘキシリ尿素を沈殿させ、これを濾過して除去した。

[0456] 滤液にAG-MP-1 (Cl⁻) 陰イオン交換樹脂を懸濁させ、クロマトグラフィカラム中に注いだ。樹脂を、ニンヒドリンで遊離のジアミンがも早検出されなくなるまで50%含水メタノールで洗浄した。ついで樹脂を50%含水メタノール中0.1N塩酸で溶出した。フルオレセインアミン塩酸塩が最初に、ついで6-カルボキシフルオレセインが溶出した。純粋な分画をブールし、ロートバップで乾燥させた。高真空中に乾燥すると、純粋なフルオレセインアミン塩酸塩 (VII 13) 3.4 gが回収された。

[0457] 4. フルオレセイン-L C₁₁-ビオチンVII 4

フルオレセインアミン塩酸塩VII 3 (350 mg, 0.61ミリモル) を乾燥DMF (15 ml) に溶解した。トリエチルアミン (300 ml)、ついでビオチンNHSエステル (445 mg, 0.8ミリモル) を添加した。反応の経過はt_{1c} (MeOH-CH₂Cl₂-酢酸-水, 20:78:1:1) で追跡した。反応が完了したと判断された時点で、DMFをロートバップで除去した。残留物をメタノール (10 ml) に溶解し、シリカゲル (10 g) を懸濁させた。この懸濁液をロートバップで流動性の粉末に乾燥し、これをジクロロメタンに懸濁し、ジクロロメタンで平衡化したシリカゲルカラム (2.5×25 cm) の頂部に適用した。カラムを上記t_{1c} 溶媒混合物で溶出した。生成物を含有する分画をブールし、溶媒をロートバップで除去した。残留物をエタノールに取り、濾過した。濾液をゆっくり蒸発させると、生成物はゴム状物として枕積した。ゴム状物を高真空中に乾燥すると、フルオレセイン-L C₁₁-ビオチンVII 4 (F-L C₁₁-ビオチン) 350 mgが得られ、これはさらに精製することなくそのまま使用した。

106

[0458] VIII. アッセイ

A. HCGアッセイ標準曲線 (Lip含有OD)

HCGアッセイはまず、HCG (量を様々に変えて)、Ab₁ (HCG)-OD/BA-C₁₁ およびAb₂ (HCG)-ビオチンを互いに混合することによって実施した。室温で1時間インキュベートしたのち、過剰量のアビシン-Lip/nC₁₁を加え、インキュベーションを室温でさらに30分間続けた。最後に、チューブをそれぞれ1分間照射し、ルミネッセンスを20秒間測定した。

[0459] プロトコール：サンプル緩衝液 (0.05 M NaPi, 0.15 M NaCl, 0.4%BSA, 20%スクロース, 4 mg/mlデキストラント硫酸 (T-500) pH 7.5) 中様々な濃度のHCG 50 μl、アッセイ緩衝液 (0.05 M NaPi, 0.15 M NaCl, 0.4%BSA, pH 7.5) 中4 μg/ml Ab₁ (HCG)-ビオチン 50 μl、およびAb₂ (HCG)-OD/BA-C₁₁ 試薬 50 μl (5×10^6 OD/チューブ) を混合する。室温、暗所で振盪しながら1時間インキュベートする。1. 5×10^{11} アビシン-nC₁₁ Lip 50 μl (7.3×10^{10} Lip/チューブ) を添加する。室温、暗所で振盪しながらインキュベートする。ハロゲンランプ (650 nmカットオフフィルターを使用した場合の光出力120 mW) を1分間照射する。ついで光源を切り、放射光の強度を20秒間測定する。結果は図3にまとめる。

[0460] B. ビオチン-L C₁₁-Fのアッセイ

試験は、50 mlのアビシン-PB/BA-C₁₁ (2× 10^{11} ピーズ/ml)、50 mlのAb₁-PB/nC₁₁ (5×10^{11} ピーズ/ml) および100 mlのビオチン-L C₁₁-F (様々な量) を、0.05 M NaPi, 0.15 M NaCl, 4 mg/ml BSA/pH 7.6 中に混合することにより実施した。この混合物を室温、暗所で、振盪しながら1.5時間インキュベートした。最後に、各チューブをハロゲンランプ光源 (650 nmカットオフフィルターを添付) で1分間照射したのち、光出力を20秒間Turner 20e ルミノメーターで光強度を積算して測定した。結果は図4にまとめる。

[0461] C. TSHアッセイ標準曲線

TSHアッセイは、0.05 M NaPi, 0.15 M NaCl, 4 mg/ml BSA/pH 7.6 中様々な濃度のTSH 200 μlを、50 μlの4 μg/ml Ab₁ (TSH)-ビオチンおよび4 μg/ml Ab₂ (TSH)-Fと混合することによって実施した。これらの混合物を室温で1.5時間インキュベートした。ついで各チューブに100 μlの 10^{10} アビシン-PB/BA-C₁₁ ピーズおよび2.5× 10^{11} Ab₁-PB/nC₁₁ ピーズ含有PBSを添加した。インキュベーションを室温でさらに1.5時間続けた。最後に各

107

チューブをハロゲンランプ光源(650nmカットオフフィルター添付)で照射したのち、光出力を20秒間Turner 20eルミノメーターで光強度を集積して測定した(図5および図6)。

【0462】例4

可溶性フォトセンシターザおよび

アクセプター油滴を使用したHCGアッセイ

I. 試薬:

アクセプター染色油滴=Ab₁(HCG)-OD/BA-C₁₀(例3, I Iに記載)

Ab₁: (HCG)-ビオチン: Pierce Chemical Co. から購入したビオチンのNHS誘導体から、例2, Iと同様にして調製

ストレバビジン-T680: Ultralite Diagnostics Co. より、上述のnC₁₀染料の可溶性類似体で標識されたストレバビジン

【0463】II. アッセイ

アッセイは、様々な量のHCGを含有するサンプル緩衝液(0.05M NaPi, 0.15M NaCl, 4mg/ml BSA, 4mg/mlデキストラント硫酸(T500), 20%スクロース/pH7.6)50μlを、アッセイ緩衝液(0.05M NaPi, 0.15M NaCl, 4mg/ml BSA/pH7.6)*

配列: CGGGCGAAGGTGAAGCGGGCGAGCATGGCG
ACCGGCAGGCCATCTGTA

プローブは、改変Cにフルオレセイン(F)が結合し、※※以下の配列

F

I

CTGCCGGTGCAGCCATGCTCGCCCGCTTCAC

を有する相補性の30マーとした。

【0465】フルオレセインは、改変ヌクレオチドN'-LCA-5-メチルデオキシシチジンCEDT Phosphoramidite(American Biotechnics, Hayward, CA)を挿入し、ついで5-カルボキシフルオレセインのN-ヒドロキシクシンイミドを30%(v/v)DMF含有pH9.0

NaHCO₃中200倍モル過剰使用して、そのエステルで標識した。粗生成物はポリアクリラミドゲル電気泳動で精製した。アビジン-PB/BA-C₁₀およびAb₁-PB/nC₁₀ビーズは前例の記載と同じであった。

【0466】標的についての標準曲線は、それを、4g/1ウシ血清アルブミンおよび10mg/mlウシ胸膜DNAを粗体として含有する50mM NaH₂PO₄, 600mM NaCl, pH7.5中に系列希釈して作成した。その一部(5μl)を、12×75ポリプロピレン試験管中、同一緩衝液5μlに取った4.8ピコモルのフルオレセイン標識プローブに添加した。混合物を覆って、72℃に10分間加熱して、完全なハイブリダイゼーションを保証した。4g/1ウシ血清アル

40

【0467】例6

ビオチン化プローブおよびフルオレセイン化

プローブに結合する合成標的の検出

ビオチン化プローブの製造

脱塩した5'-アミノ-修飾オリゴヌクレオチド(30マー)

5'-UAA-TAC-AGG-TTG-TTG-CC
T-TCA-CGC-TCG-AAA-3'

50ナノモルを0.5mlの0.1M炭酸塩緩衝液、pH9.0に溶解した。この緩衝溶液に、スクシンイミジル-6-(ビオチンアミド)ヘキサノエート(Pier

108

*中4μg/ml抗-HCG-ビオチンおよび5×10¹¹油滴含有Ab₁(HCG)-OD/BA-C₁₀試薬50μlと混合して実施した。この混合物を、室温、暗所で1時間インキュベートした。ついで、アッセイ緩衝液中2μg/mlのストレバビジン50μlを各チューブに加え、インキュベーションをさらに30分間続けた。最後に、各チューブをハロゲンランプ光源(650nmカットオフフィルター添付)で1分間照射し、Turnerの20eルミノメーターを用いて20秒間光出力を測定した。結果は図7にまとめた。

【0464】例5

標的オリゴヌクレオチドの均一系アッセイ

標的配列は大腸菌K12 DNA J遺伝子(J. C. A. Bardwell, K. Tilly, E. Craig, J. King, M. Zyllicz & C. Georgopoulos, J. Biol. Chem. 261: 1782-1785, 1986)から選択した。Blotsearch 8750を用いるホスファイトトリエステル法によって、以下の配列をもつ50マーを製造し、Biotin-ONTM Phosphoramidite(Clontech, Palo Alto, CA)を用いて5'末端にビオチンを導入した。

配列: CGGGCGAAGGTGAAGCGGGCGAGCATGGCG
ACCGGCAGGCCATCTGTA

プローブは、改変Cにフルオレセイン(F)が結合し、※※以下の配列

F

I

CTGCCGGTGCAGCCATGCTCGCCCGCTTCAC

30 プミン含有50mM NaH₂PO₄, 600mM NaCl, pH7.5の50μl中に約10¹¹のドナー(センシティザー)(Ab₁-PB/nC₁₀)を加え、ついで同一の緩衝液50μl中2.5×10¹¹アクセプター(Avidin-PB/BA-C₁₀)ビーズを添加した。旋回振盪機上、室温で30分間振盪したのち、各チューブを前例に記載した650nmフィルター付きハロゲンランプを用いて1分間照射した。Turnerルミノメーターを用いて20秒間、光の発生を測定した。得られた標準曲線は図8に示す。

40

【0467】例6

ビオチン化プローブおよびフルオレセイン化

プローブに結合する合成標的の検出

ビオチン化プローブの製造

脱塩した5'-アミノ-修飾オリゴヌクレオチド(30マー)

5'-UAA-TAC-AGG-TTG-TTG-CC
T-TCA-CGC-TCG-AAA-3'

50ナノモルを0.5mlの0.1M炭酸塩緩衝液、pH9.0に溶解した。この緩衝溶液に、スクシンイミジル-6-(ビオチンアミド)ヘキサノエート(Pier

109

ce #21336-G) の DMF 中 120 mg/ml 溶液 125 μl を加えた。混合物を一夜インキュベートし、製造用電気泳動 (TBE (Tris ホウ酸 EDTA) 緩衝液 : 89 mM Tris (トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン) 塩基, 89 mM ホウ酸, 2.5 mM Na, EDTA (エチレンジアミン四酢酸), pH 8.3) を用い、400 ボルトで 4 時間精製した。ビオチン化オリゴヌクレオチドをゲルから切り出し、3 ml の 0.1 M NH₄CO₃ により 37°C で一夜溶出した。この物質を再び Sep-Pak (C-18 カラム, Waters #51910) 上で精製し、真空乾燥し、二重蒸留水中に懸濁した。ビオチン化プローブの収量は 34.8 ナノモル (58%) であった。

【0468】フルオレセイン化プローブの製造

中央のシットシン (位置 14) アミノ修飾オリゴヌクレオチド (30マー) 5'-CTG-CCG-GTG-CGC-CAT-GU-T-CGC-CCG-CCT-CAC-3' 50 ナノモルの 0.1 M NaHCO₃ 緩衝液, pH 9.6 (190 μl) およびアセトニトリル (120 μl) の混合物中溶液を調製した。5/6 カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル (Molecular Probes, #01112) の DMF 中 0.1 M 溶液 200 μl を上記緩衝液に加えた。混合物を一夜室温でインキュベートした。以後の工程はビオチン化プローブについて上述した工程と同じである。フルオレセイン化プローブは 41% の収率を得られた。

【0469】アッセイ操作

アッセイ緩衝液 : 10 mM Tris [トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン], 50 mM KCl, pH 8.3, 5 mg/ml デキストラン硫酸, 0.5 M NaCl, 1 mg/ml BSA (ウシ血清アルブミン) および 25 μg/ml ウシ胸腺 DNA 含有。フルオレセイン化プローブ (1.5 ピコモル) およびビオチン化プローブ (1.2 ピコモル) を含有するアッセイ緩衝液 4.0 ml を、アッセイ緩衝液中に系列希釈した合成標的 DNA 10 μl を添加した。混合物を 55°C で 5 分間ハイブリダイズした。ビーズ (それぞれ 50 μl のアッセイ緩衝液中 20 μg のアビジンビーズおよび 30 μg の抗フルオレセインビーズ) を添加した。ビーズを含有する溶液を 55°C で 15 分間インキュベートした。

【0470】アビジンビーズは、0.175 μl カルボキシル化ポリスチレンビーズにベンザルアクリダンを負荷して製造し、EDAC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド, Sigma-Chemical Co., #E-6383) 法によってアビジンを付加させた。

【0471】ベンザルアクリダンは、無水トライヒドロフラン (THF) 中 10-ジメトキシホスフィニル-9

110

-メチルアクリダン (Monatsh Chem. 114, 3, 1988) に -78°C (アセトン/ドライアイス浴) においてアルゴン気相下、ヘキサン中 1.6 M n-ブチルリチウム溶液 0.413 ml を添加して製造した。t-ブチルリチウム溶液を添加し、t-ブチルリチウムの添加 20 分後に THF 中上記アミドの溶液を加えた。反応溶液を一夜放置して、温度を室温に上昇させた。ついで、生成物を TLC (シリカゲル-3:7 酢酸エチル/ヘキサン) で単離した。単離された生成物はマススペクトル分析および NMR によって分析し、暗所に保存した。

【0472】抗フルオレセインビーズは、0.04 μl ポリスチレンカルボキシル化ビーズにテトラ-n-デシル-AI-フタロシアニン (Ultra Diagnostics, ロット番号 GR11-82) を負荷して製造し、ビーズに EDAC 法を用いて抗フルオレセイン抗体を付加させた。

【0473】シグナルは、ビーズを含有する溶液を 650 nm カットオフフィルターを付したハロゲンランプで 20 秒間照射して読み取った。ルミネッセンスは 20 秒間測定した。結果は表 1 にまとめ、図 9 に示す。

【0474】例 7

ビオチン化増幅生成物の検出

ビオチン化配列の PCR による製造

標的: 大腸菌ゲノム DNA

プライマー: 5'-ビオチン化 24マー-

5'-UCA-TGG-TTC-TGG-TCA-GG-T-GCA-GAT-3'

および非ビオチン化 18マー

5'-TTT-GAG-CGC-GGG-CTG-TT-G-3'

各 100 nM

循環条件:

単一サイクル:

94°C: 3 分

59°C: 1 分

72°C: 1.5 分

ついで 3.5 サイクル:

94°C: 1 分

59°C: 1.5 分

72°C: 2 分

【0475】フルオレセイン化プローブを用いる検出

アッセイ緩衝液中 1.5 ピコモルのフルオレセイン化プローブ 10 μl を例 6 に記載の操作と同様にして調製し、20 μl の PCR 生成物に、様々な初期標的濃度において添加した。混合物を 95°C で 5 分間変性し、ついで 55°C で 5 分間ハイブリダイズさせた。ビーズ (50 μl のアッセイ緩衝液中、20 μg のベンザルアクリダンおよび 30 μg の AI-フタロシアニンビーズ) を添加した。ビーズを含有する溶液を 55°C で 15 分間イン

111

キュベートした。シグナルは例6に記載の操作後に読み取った。結果は表2にまとめる。

【0476】例 8

総トリヨードサイロニンのアセイ

1. ビーズの製造

原料

175 nmカルボキシレート修飾ラテックス : Bangs Laboratories

エチレングリコール、エトキシエタノール、ベンジルアルコール、クロロフィル-a : Aldrich
ユーロビウム (EuTTA) : Kodak

オリオクチルホスフィンオキシド (TOPO) : Aldrich

ジオキセン [1-(4-ジメチルアミノフェニル)-6-フェニル-1,4-ジオキセン] : K. A. Zakiya, T. Kissel, A. L. Thayer, P. A. Burns & P. Schaap : Photoc hem. Photobiol., 30, 35-44 (1979) に記載された操作を改良して製造した。

【0477】操作

1. クロロフィル-aセンシタイザービーズ

ベンジルアルコール中クロロフィル-a溶液 (1.0 ml, 0.6 mM) を105°Cで8.0 mlのベンジルアルコールに加えた。175 nmのサイズのカルボキシレート修飾ラテックスの水懸濁液 (10%, 1.0 ml) をベンジルアルコール溶液に添加した。この混合物を105°Cで5分間攪拌し、室温に冷却した。エタノール (10.0 ml) を加え、混合物を遠心分離した。ベレットを1:1エタノール-水混合物 (10.0 ml) に再懸濁し、懸濁液を遠心分離した。同じ再懸濁および遠心分離操作を水 (10.0 ml) で反復し、ベレットを水 (1.8 ml) に再懸濁した。

【0478】性質

A. 染料濃度：上記ビーズ懸濁液10 μlをジオキサン (990 μl) に添加して調製した溶液は、660 nmに0.11の吸収を有することが明らかにされた。これはビーズ1g中2.6マイクロモルのクロロフィル-aに相当する。

【0479】一重項酸素の発生：2mlのリン酸塩緩衝液 (50 mM, pH 7.5, 100 mM NaCl含有) 中、クロロフィル-aビーズ (200 μg)、 2×10^{-4} モルのアントラセン9, 10-ジプロピオン酸 (ADPA) の混合物を、645 nmカットオフフィルターを付したタンクステン-ハロゲンランプで20分間照射した。ビーズを通過して除き、酸素化生成物の濃度を400 nmにおいて分光測定法により測定した。速度は1分あたり酸素化生成物3.0ナノモルであった。同一の条件下、可溶性センシタイザー、アルミニウムフタロシアニンテトラスルホン酸アルミニウムは同量の酸素

112

化生成物を生成した (ビーズ中のセンシタイザーの量は $200 \cdot 10^{-4} \cdot 2.6 \cdot 10^{-4} = 520$ ピコモルであった。

【0480】2. クロロフィル-a/テトラブチルスクアレートセンシタイザービーズ

カルボキシル化ラテックスビーズ (サイズ17.5 nm、水中10%固体、30.0 ml) を遠心分離した。上清を捨て、ベレットはエチレングリコール (60.0 ml) に再懸濁した。懸濁液を100°Cに加熱した。クロロフィル-a 1.67 mM、テトラブチルスクアレート [1,3-ビス(4-ジブチルアミノフェニル)スクアレート] 3.33 mMのベンジルアルコール溶液9.0 mlを徐々に、3分を要して懸濁液に添加した。加熱を7分間継続したのち、懸濁液を水浴中で室温に冷却した。ベンジルアルコール懸濁液を冷エタノール (120 ml) に加えた。混合物を遠心分離し、上清は捨てた。ベレットを水中50%エタノールに再懸濁し、懸濁液を遠心分離した。同じ再懸濁、遠心分離操作を水中50%エタノール (30 ml) を用いて反復した。

20 【0481】性質

A. 染料濃度：ビーズ中のテトラブチルスクアレートの濃度は、クロロフィル-aビーズについて上述したのと同様にして分光測定法で測定した。ビーズ中44 μM染料が認められた。

【0482】B. 一重項酸素の生成：エタノール中ADPAの5 mM溶液25 μlを、リン酸塩緩衝液pH 7.0 (20 mM, 50 mM NaCl含有) 中ビーズ (100 μg) の懸濁液に添加した。混合物を上述のように、610 nm長通過フィルターを用いて照射した。一重項酸素の生成速度はADPAの吸収 (400 nm) の低下速度から計算した。このビーズは7·10⁻⁴マイクロモル/分の一重項酸素を生成することが明らかにされた。

【0483】3. ジオキセン/EuTTA/TOPO7 クセプタービーズ

175 nmカルボキシル化ラテックスビーズ (水中10%懸濁液) 20 mlをエトキシエタノール (20.0 ml) に添加した。混合物を90°Cに加熱した。10 mMジオキサン、20 mM EuTTAおよび60 mM TOPOのエトキシエタノール溶液20 mlを、混合物に添加した。加熱を7分間、97°Cまでの温度で継続した。混合物を室温に冷却した。エタノール (40.0 ml) を加え、混合物を遠心分離した。ベレットを80%エタノールに再懸濁し、懸濁液を遠心分離した。再懸濁および遠心分離の操作を10%エタノール (36 ml) を用いて反復した。

【0484】性質

A. 染料濃度：ビーズ中のEuTTA濃度は上述のように分光測定法で測定し、0.07 Mであることが明らかにされた。ジオキサンの濃度はEuTTAの存在下には

113

測定できないので、ジオキセンのみを負荷したビーズ中で同じ条件下に測定した。濃度は0.016Mであることが明らかにされた。

[0485] B. シグナル生成：リン酸緩衝液(0.5ml, 2.0mMリン酸塩, 5.0mMNaCl, 0.1%Tween 20, pH7.0)中ビーズ(2.5μg)の懸濁液を、同じ緩衝液中2μMアルミニウムフタロシアニンテトラスルホネートの溶液と混合した。混合物を610nm長通過フィルターを付した125Wタンゲステン-ハロゲンランプで1分間照射した。照射後、混合物をTurner TD-20e ルミノメーター中に置き、ルミネッセンスを20秒間測定した。強度は327RLU(相対光量単位)/秒であった。放射光の波長は、Perkin-Elmer 650-40走査スペクトロフルオリメーターを用いて測定した。主要な放射ピークは615nm付近に集中した。

[0486] 11. アッセイ操作

40 nmビーズへの抗体のEDAC/NHSカップリング

7.3. 6mgのスルホ-NHS(N-ヒドロキシスクシンイミド, Pierce Chemical Co. #24510G)を、水中4mg/mlカルボキシレート修飾40nmポリスチレンビーズ(クロロフィル-aおよびテトラブチルスクアレートで染色)の懸濁液6mlに溶解した。0.5M Na₂HPO₄ 1.36μlを加えた。pHを5.2に調整した。さらに1.36μlの水を添加した。130.4mgのEDCA[1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩, Sigma Chemical Co. #E-6383]を4.54μlの水に取り、搅拌したビーズ懸濁液に徐々に加えた。この懸濁液を室温で20分間インキュベートした。ビーズを、Sorvall SA-600ローターを用い15,000rpm, 4°Cで20分間遠心分離した。上清は捨てた。ついで、ビーズを1.2mlの5mMリン酸ナトリウム、pH5.8中に再懸濁し、懸濁液を超音波処理してビーズを再度分散させた。1.7mg/ml IgG(モノクローナル抗-フルオレセイン)+6.7mg/ml BSA+1.7mM boraxを含有する溶液(pH9.2)4.8mlを搅拌しながらビーズを徐々に加え、一夜4°Cで穏やかに混合した。800μlの2Mグリシン、ついで0.1M borax中50mg/ml BSA 2.8mlをビーズ懸濁液に加えた。懸濁液を超音波処理し、4°Cで3時間穏やかに混合した。ビーズを15,000rpmで30分間遠心分離した。上清は捨てた。ビーズを3mlの5mMリン酸ナトリウム+150mM NaCl, pH7.6に再懸濁し、懸濁液を超音波処理した。遠心分離、再懸濁および超音波処理工程を計3回反復した。3回目の遠心分離後、ビーズを2.25mlの5mMリン酸ナトリウム+150mM NaCl, pH7.6に再懸濁した。懸濁液を超音波処理して、4°Cで保存した。

114

6に再懸濁した。得られた懸濁液を超音波処理して、4°Cで保存した。

[0487] 175 nmビーズへのアビシン-DのEDAC/NHSカップリング

4. 4mgのスルホ-NHSを、水中2.5mg/mlのカルボキシレート修飾175nmポリスチレンビーズ(ジオキセン/EuTTA/TOPOで染色)2.5mg/mlの懸濁液0.4mlに溶解した。0.0160mlの0.25MNa₂PO₄を添加した。0.030mlの水に溶解した8mgのEDACを巡回させたビーズ懸濁液に徐々に加えた。懸濁液を室温で20分間インキュベートした。ビーズを、Sorvall SA-600ローターを用い、15,000rpm, 4°Cで20分間遠心分離した。上清は捨てた。

[0488] ビーズを0.6mlの0.005Mリン酸ナトリウム、pH5.8に再懸濁した。懸濁液を超音波処理してビーズを再び懸濁させた。ビーズを再び、1.33mg/mlアビシン-D(Vector)+1.7mM borax含有pH9.2の溶液3mlに搅拌しながら、徐々に添加し、一夜4°Cで穏やかに混合した。DMF中1M無水コハク酸0.004mlを加えた。懸濁液を、穏やかに混合しながら4°Cで1時間インキュベートした。1.0mMリン酸ナトリウム+150mM NaCl, pH7.0中50mg/ml BSA 0.4mlを添加した。懸濁液を4°Cで3時間穏やかに混合した。ビーズを15,000rpmで30分間遠心分離した。上清を捨てた。ビーズを、3mlの50mMリン酸ナトリウム+150mM NaCl, pH7.6に再懸濁した。懸濁液を超音波処理した。遠心分離、再懸濁および超音波処理工程を計3回反復した。3回目の遠心分離後、ビーズを2.25mlの50mMリン酸ナトリウム+150mM NaCl, pH7.6に再懸濁した。懸濁液を超音波処理して、4°Cで保存した。

[0489] 総T: アッセイ

アッセイ緩衝液: 0.075M・バルビタール, 0.2M NaCl, 0.4% BSA, 1.25%マウスIgG, 1.0mg/mlデキストラン硫酸(分子量500,000), 1.0mg/mlデキストランT-500, 1.10μg/ml凝集IgG

[0490] ビーズ

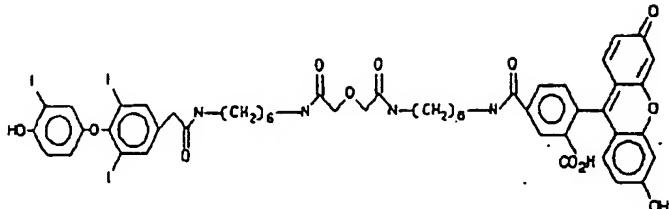
アクセプタービーズ: アビシン-EDAC, 175nm, ジオキセン/EuTTA/TOPOを負荷
センシタイザービーズ: 抗フルオレセイン-EDAC, 40nm, クロロフィル-a/スクアレートを負荷

[0491] アッセイプロトコール

アッセイ緩衝液中8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸アンモニウム塩(Sigma, A-3125)溶液(0.75mg/ml)50μlをT: 固体溶波またはサンプル50μlに加えた。アッセイ緩衝液100μlを添加した。アッセイ緩衝液中ビオチン化抗-T: (7

115

0 ng/ml) 50 μlを添加した。アッセイ緩衝液 * [化40]
(50 μl) 中、トレーサー、T₁-LC₁₁-F1 *

T₁-LC₁₁-F1

(1. 8 ng/ml) を添加した。混合物を 37°Cで 1
5 分間インキュベートした。センシタイザーピーズ (5
0 μg) やびアクセプターピーズ (6. 25 μg) の
アッセイ緩衝液中懸濁液 500 μlを添加し、混合物を
37°Cで 15 分間インキュベートした。「停止溶液」
(50 μl) (10 μM フルオレセイン、0. 5 mM ビ
オチン) を添加した。シグナルは、610 nmカットオ
フフィルター付きハロゲンランプで、照射 1分、測定 2
0 秒で読み取った。

※

B10-プローブおよびF1-プローブに結合する標的蛋白質の検出

標的 (ピコモル / 150 μl) (pM)	RLU	標的濃度
1. 0.7	1677	7490
2. 0.54	1671	3740
3. 0.27	1407	1930
4. 0.13	979	930
5. 0.067	688	461
6. 0.034	399	230
7. 0.017	192	120
8. 0.008	95	57
9. 0.004	58	30
10. 0.002	30	15
11. 0	17	
12. 0	16	

[表5]

ビオチン化増幅生成物の検出生 成 物

生 成 物	RLU
1. 20% (10 ⁴)	79
2. 20% (10 ⁴)	45
3. 20% (10 ⁴)	25
4. 20% (0)	9

* 増幅反応容積の 20%、() 内は反応混合物中の初期の標的分子数

[図面の簡単な説明]

る。

[図1] ビタミンB₁₂の検定結果のグラフによる描写で
ある。

[図3] 本発明によるHCGの検定結果のグラフによる
描写である。

[図2] ジゴキシンの検定結果のグラフによる描写である 50 [図4] 本発明による試験結果のグラフによる描写である

117

118

る。

【図5】本発明によるTSHに対する検定結果のグラフによる描写である。

【図6】図5のグラフによる描写の一部である。

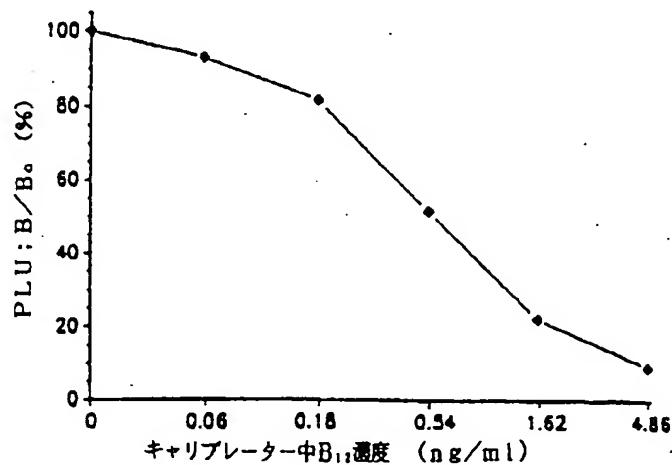
【図7】本発明によるHCGに対する別の検定結果のグラフによる描写である。

【図8】DNAハイブリッド検出検定の結果のグラフによる描写である。

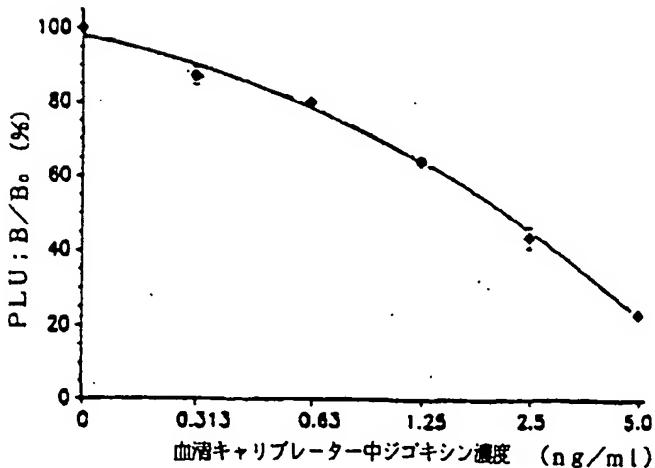
【図9】合成標的の検出結果のグラフによる描写である。

【図10】全トリヨードチロニン検定のグラフによる描写である。

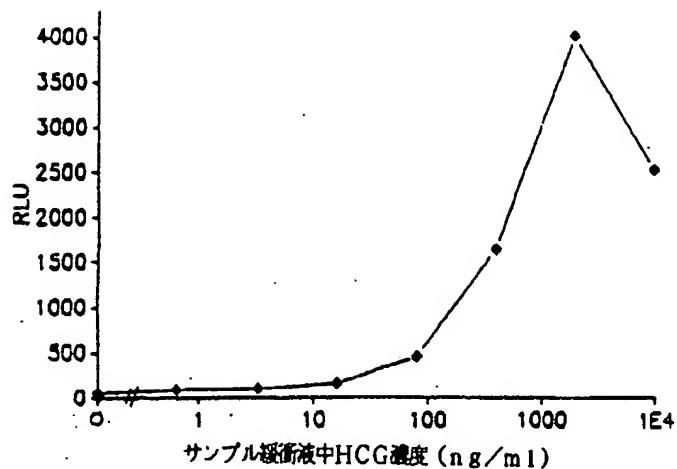
【図1】

B₁₁-アッセイ標準曲線

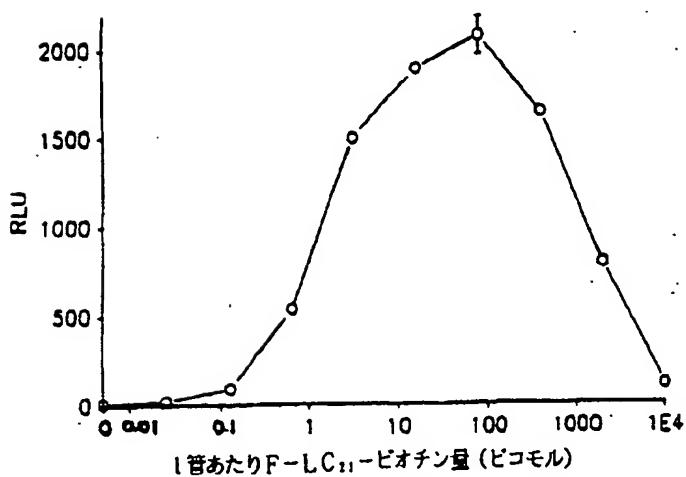
【図2】

5.5%血清中ジゴキシンアッセイ標準曲線

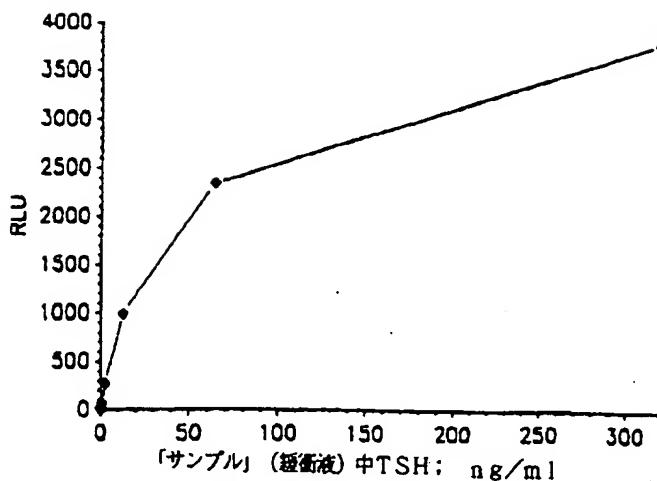
[図3]

HCGアッセイ検査曲線

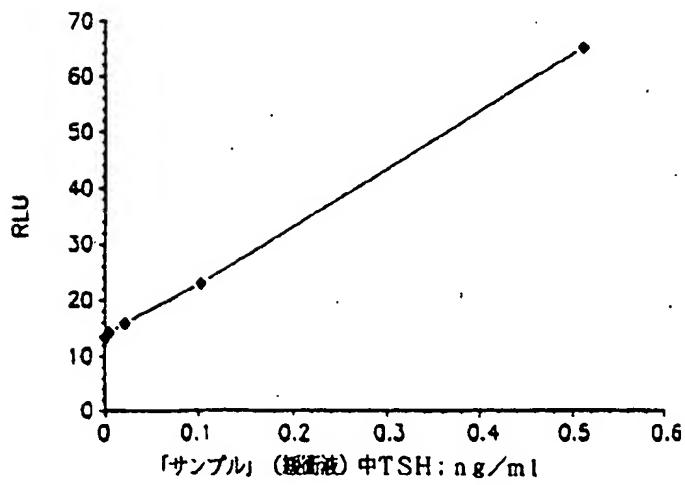
[図4]

F-LC₁₁-ビオチンの滴定

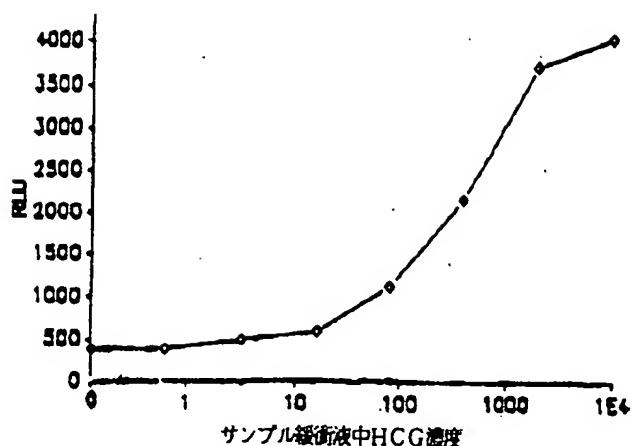
〔図5〕

緩衝液中TSHアッセイ標準曲線

〔図6〕

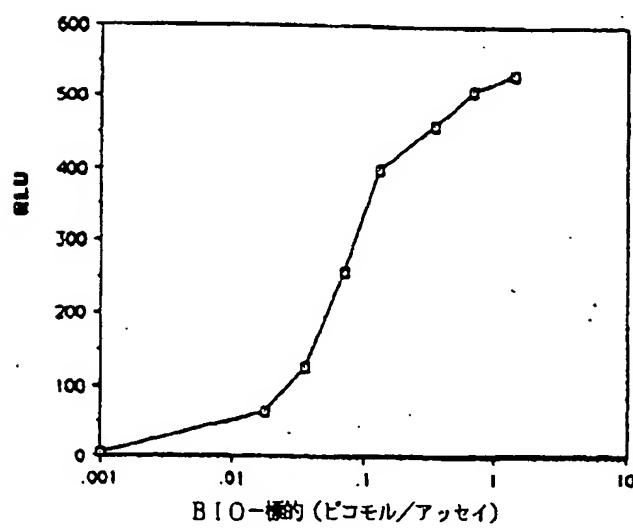
緩衝液中TSHアッセイ標準曲線

【図7】

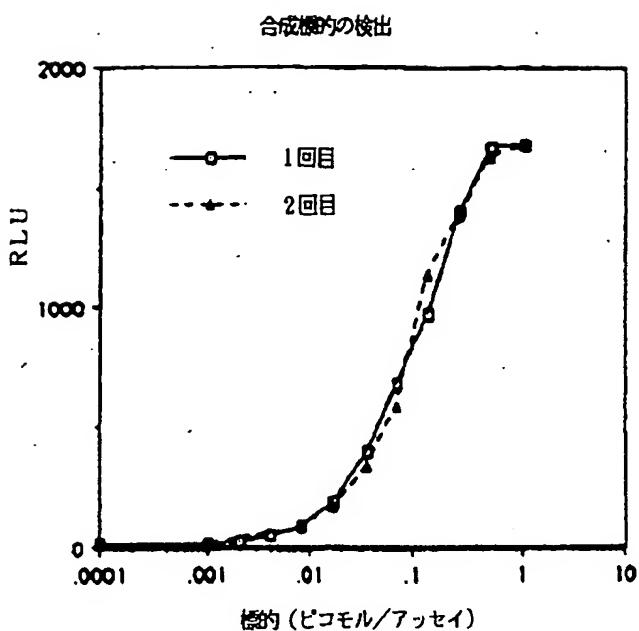
HCGアッセイ標準曲線

【図8】

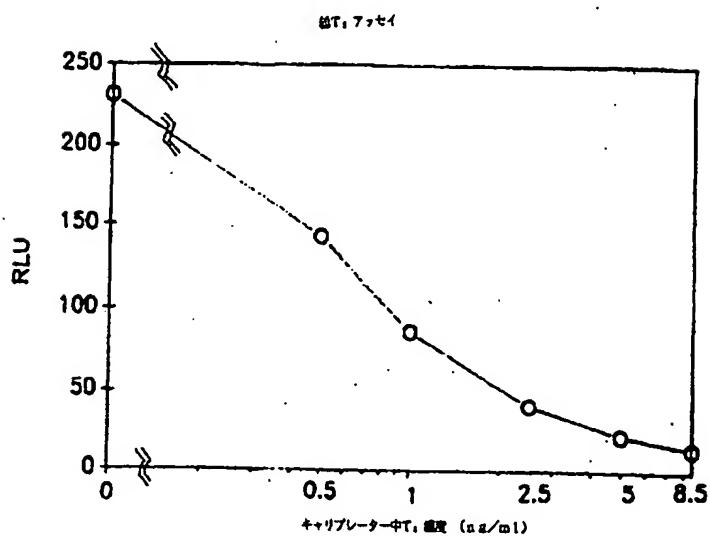
DNAハイブリッド検出



【図9】



【図10】



フロントページの続き

(72)発明者 フライアー キラコシアン
アメリカ合衆国カリフォルニア州サン ジ
ヨセ, ウイリアムズ ロード 4851
(72)発明者 ジョン エス. ピーズ
アメリカ合衆国カリフォルニア州ロス ア
ルトス, ロシタ アベニュー 699

(72)発明者 ユリ ダニロフ
アメリカ合衆国カリフォルニア州マウント
ビュー, ロイド ウエイ 1522
(72)発明者 ダニエル ピー. ワグナー
アメリカ合衆国カリフォルニア州サニイベ
イル, ティコンデロガ 951

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.